

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS PARA A OBTENÇÃO DE CERVEJA SEM
GLÚTEN: UMA REVISÃO DA LITERATURA**

Vitória Costa Conter Silveira

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS PARA A OBTENÇÃO DE CERVEJA SEM
GLÚTEN: UMA REVISÃO DA LITERATURA**

Vitória Costa Conter Silveira

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para a obtenção do título de
Engenheiro de Alimentos do Instituto de
Ciência e Tecnologia de Alimentos da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul

Orientador: Profº Dr. Rafael Costa
Rodrigues

Porto Alegre

2021

Trabalho de Conclusão de Curso
APLICAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS PARA A OBTENÇÃO DE CERVEJA SEM
GLÚTEN: UMA REVISÃO DA LITERATURA

Vitória Costa Conter Silveira

Aprovada em: __/ __/ ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues (Orientador)
Departamento de Tecnologia de Alimentos
ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Departamento de Tecnologia de Alimentos
ICTA/UFRGS

Me. Carolina Partichelli
Departamento de Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

À UFRGS e ao ICTA por me proporcionarem um ensino superior de qualidade e me permitirem participar de diversas atividades ao longo desses anos de graduação, as quais foram essenciais para o meu desenvolvimento.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite de avaliar e contribuir para este trabalho.

Às professoras Nara Atz e Regina Felisberto, do corpo docente do Curso Técnico em Química do Instituto Federal do Rio Grande do Sul, por me orientarem nos trabalhos de conclusão do Curso Técnico em Química e agregarem na minha formação.

A professora Cláudia Wyrvalski, do corpo docente do Curso Técnico em Química do Instituto Federal do Rio Grande do Sul, por tudo que passamos juntas e por estar sempre comigo nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus amigos, por me apoiarem sempre e estarem comigo o tempo todo durante essa jornada. Não tenho palavras para descrever como vocês foram importantes para mim. Agradeço especialmente a Caroline Maders, pela amizade que construímos ao longo da faculdade a qual quero levar para o resto da vida.

Ao meu orientador Rafael Costa Rodrigues, por ter me dado oportunidade como bolsista de Iniciação Científica ao longo da graduação e por ter aceitado ser meu orientador agora no trabalho de conclusão. Te agradeço muito por todos os ensinamentos e toda a vivência que pude ter no Laboratório de Biocatálise de Tecnologia Enzimática. E te agradeço mais ainda por toda a força e apoio durante a realização desse trabalho de conclusão.

À minha família, em especial à minha vó Marlene Conter Silveira.

Agradeço a minha mãe, Ieda da Silva Costa, por sempre me apoiar nas minhas jornadas, e estar comigo sempre. Eu Te Amo Infinito.

Por último, agradeço ao meu pai, Marcelo Conter Silveira (in memoriam), o qual dedico este Trabalho de Conclusão de Curso. Você esteve me apoiando em todas as minhas jornadas, esteve comigo quando eu entrei na graduação e eu sei que estará olhando por mim na minha formatura. Eu Te Amo Infinito.

RESUMO

A cerveja é uma bebida resultante da fermentação a partir da levedura cervejeira, possuindo, tradicionalmente, os ingredientes principais: água potável, malte e lúpulo. Embora seja uma bebida antiga e tradicional, existe uma parcela da população que não pode consumir esse produto, são as pessoas portadoras de desordens relacionadas ao glúten. Isso se dá, pois o malte é feito a partir do grão de cevada, e este grão possui algumas proteínas de reserva, as hordeínas, que são ricas em aminoácidos prolina e apresentam toxicidade para essas pessoas. A doença celíaca, nesse contexto, é uma das desordens mais conhecidas popularmente, e está presente em mais de 1 % da população mundial, sua principal característica são alterações na mucosa do intestino delgado, acarretando em má absorção de nutrientes e podendo evoluir para outras manifestações clínicas de acordo com o nível de sensibilidade de cada indivíduo. Considerando que o seu principal tratamento é através de uma dieta isenta de glúten, e que há uma demanda dos celíacos em relação a dificuldades para se adequar nesses novos hábitos, refletindo diretamente nas suas relações interpessoais e com o meio o presente trabalho trata-se uma revisão da literatura sobre a produção de cerveja sem glúten através do uso de peptidases exógenas. Constatando que já existem trabalhos relacionados a essa demanda, especialmente na última década, e já é possível a obtenção de uma cerveja sem glúten a partir de malte de cevada, porém ainda há muito o que estudar em relação a metodologias de otimização de processo, tipos de peptidases usadas, concentrações enzimáticas ideais e entre outros parâmetros, a fim de tornar cada vez mais acessível a presença desse produto na realidade dos potenciais consumidores.

Palavras-chave: Cerveja sem glúten; peptidases; doença celíaca.

ABSTRACT

Beer is a fermented beverage from yeast, which have, traditionally, these ingredients: potable water, malt and hop. Although beer is an old and traditional beverage, there is some people who cannot consume this product, that are those related to gluten disorder. This happens because traditionally malt is from barley and this grain have some storage proteins, the hordeins, which are rich in proline amino acids and has toxicity to these people. In this context, celiac disease is the most popular gluten disorder, it was estimated to affect approximately 1 % of the world population, causing damages in the small intestine lining, preventing it from absorbing some nutrients (malabsorption) and can involve to other manifestations according to the sensitivity of each individual. Considering that its main treatment is having a gluten-free diet, and that there is a difficult for celiac people to adapting to these new habits, reflecting directly on their relations with the environment and feelings, the present study is a review from literature about the production of gluten-free beer with exogenous peptidases. There are some studies related to this theme, especially in the last decade, and it is already possible obtain a gluten-free beer from barley malt, nevertheless there is some room to study about different methodologies to optimize the process, different peptidases sources, different enzymatic concentrations and another aspects, for the purpose of making this kind of product more accessible in potential consumers reality.

Key words: Gluten-free beer; peptidases; celiac disease.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius (unidade de temperatura)
a.C	Antes de Cristo
ACELBRA	Associação dos Celíacos do Brasil
AGEITEC	Agência Embrapa de Informação Tecnológica
DC	Doença Celíaca
FAO	Food and Agriculture Organization
FENACELBRA	Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IUMBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NC – IUMBM	Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
POFs	Pesquisas de Orçamento Familiar
PIB	Produto Interno Bruto
ppm	Partes Por Milhão (unidade de concentração)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
WHO	World Health Organization

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo Cervejeiro	14
Figura 2: Desordens relacionadas ao glúten	19
Figura 3: Comparação entre as vilosidades da mucosa do intestino delgado	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Faixa de temperatura ótima de atuação das enzimas.....	16
Tabela 2: Sistema de classificação das enzimas.....	22
Tabela 3: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação.....	30
Tabela 4: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação para cerveja American Pale Ale	32
Tabela 5: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação para cerveja Stout.....	33
Tabela 6: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação.....	34
Tabela 7: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação.....	35
Tabela 8: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Cerveja.....	12
2.1.1. Legislação	13
2.1.2. Processamento.....	14
2.2 Glúten	19
2.2.1. Doença Celíaca	19
2.3 Enzimas	21
2.3.1 Proteases	23
2.4 Cerveja sem glúten	24
2.4.1 Métodos de quantificação de glúten na cerveja	25
3 METODOLOGIA	28
4 CERVEJA SEM GLÚTEN POR APLICAÇÃO ENZIMÁTICA	29
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, a cerveja é dita como uma bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro. Seu consumo e produção estão na vida do homem desde a antiguidade, através dos anos, a cerveja foi difundida ao longo das civilizações, estando presente, atualmente, em todas as regiões do mundo. No Brasil, o setor cervejeiro possui grande importância econômica para o país, já que é um dos maiores produtores mundiais. Seu consumo e comercialização são práticas consolidadas e em ascensão, visto que, a cada ano sua abrangência e seus índices de consumo aumentam, conforme é mostrado em dados de pesquisas nacionais.

Por ser elaborada a partir de cevada, a cerveja é um produto que contém glúten na sua composição final, que é o nome dado ao conjunto de proteínas de reserva encontradas no endosperma de algumas sementes de cereais. Embora conste no rótulo, é desconhecido para a maioria da população que a cerveja é um produto que contém glúten. A oferta de produtos sem glúten já existe, e, cada vez mais, vêm sendo desenvolvidos para atender a essa demanda da população, uma vez que é relatado por indivíduos celíacos uma dificuldade relacionada a alimentação, visto que uma dieta sem glúten não é habitual às pessoas em geral. Essa necessidade é também refletida nas práticas e eventos sociais, onde a cerveja é, por vezes, consumida. Ainda que ela não seja um item essencial nas práticas de consumo da população, está, muitas vezes, associada a interações sociais, ao sentimento dos indivíduos envolvidos e à formação de vínculos.

Buscando atender a essa parcela da população e também à outras pessoas com interesse nesse tipo de produto, a cerveja sem glúten é uma realidade no mercado brasileiro nos últimos anos. A legislação já estabelece conceitos para a cerveja sem glúten embora ainda não exista um limite estabelecido pelo país, é necessário a consulta em legislações estrangeiras. Além disso, cada vez mais vem sendo realizados estudos a fim de viabilizar a produção desse tipo de produto através

de pesquisas experimentais acerca das diversas possibilidades tecnológicas de se obter um produto sem glúten.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é fazer uma revisão da literatura sobre a produção de cerveja sem glúten, onde serão abordadas as mais recentes pesquisas relacionadas ao tema em que foram utilizadas enzimas exógenas para redução do glúten.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerveja

Sabe-se atualmente que a produção e o consumo de bebidas alcoólicas são umas das atividades mais antigas desenvolvidas pelo homem (VENTURINI FILHO, 2016). As bebidas alcoólicas fermentadas foram originárias da Antiguidade através de processos espontâneos de fermentação, sendo mencionadas nos registros históricos de diversas civilizações o uso de diversas fontes naturais, como frutas, grãos, raízes e folhas (AQUARONE et. al, 2001). Acredita-se que a produção de cerveja, especificamente, tenha se iniciado por volta de 8.000 a.C, havendo registros da bebida entre os povos da Suméria, Babilônia e Egito (AQUARONE et. al, 2001). Através dos egípcios, a cerveja ficou conhecida pelos outros povos orientais, fazendo com que ela chegasse até a Europa e, a partir daí, tivesse destaque entre os povos bárbaros de origem germânica, os quais tiveram sucesso e reconhecimento na arte de fabricar cerveja (AQUARONE et. al, 2001).

No Brasil, hábito de consumir cerveja iniciou-se de fato por volta de 1808, durante a vinda da família real portuguesa (VENTURINI FILHO, 2016) que, através da assinatura do tratado econômico de abertura dos portos às nações amigas de Portugal, permitiu que nações europeias estabelecessem relações comerciais com o Brasil. Nesse contexto, deu-se início a inserção da bebida no território brasileiro através da vinda de cervejas de origem europeia, principalmente da Inglaterra, que na época era a maior produtora de cerveja da Europa e, além disso, exercia grande influência sobre Portugal, permanecendo fortemente dominante no país até os anos setenta, quando a cerveja alemã começou a ser consumida preferencialmente e também com a produção de algumas cervejas locais (DE PAULA SANTOS, 2003). (ALEIXO, 2014)

Atualmente, segundo dados do MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), o setor cervejeiro no Brasil é o terceiro maior do mundo em litros produzidos, ficando atrás somente da China e dos Estados Unidos. Com mais de 13 bilhões de litros consumidos por ano, esse setor representa cerca de 2 % do PIB (Produto Interno Bruto) do país, é responsável por aproximadamente 2,7 milhões de empregos e possui um faturamento de cerca de R\$ 100 bilhões. O setor cervejeiro no Brasil, apresenta uma tendência crescente de produção nos últimos 30 anos, indo ao

encontro do aumento da demanda de novos registros de estabelecimentos produtores de cerveja na última década. Segundo o MAPA, esse aumento foi de seis vezes, comparando os últimos dados os quais se tem registros, de 2007 até 2017. Entre os estados que lideram o ranking nacional pelo número de cervejarias em seu território, está o estado de São Paulo seguido pelo Rio Grande do Sul (MARCUSO; MÜLLER, 2017)

Pesquisas de Orçamento Familiar (POFs) realizadas pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) em relação ao consumo alimentar dos brasileiros indicam que, comparando os estudos da POF 2008 – 2009 e da última publicação divulgada, a POF 2017 – 2018, houve um aumento de 11,5 % no consumo médio geral de cerveja *per capita*. Além disso, o consumo médio de cerveja entre o gênero feminino dobrou, enquanto o consumo médio entre o gênero masculino se manteve próximo à estabilidade. Esses dados se correlacionam e permitem concluir que o aumento de consumo *per capita* geral deu-se principalmente devido a maior participação do público feminino como consumidor desta bebida.

A tendência de crescimento tanto na produção quanto no consumo de cerveja pelos brasileiros é constatado com base na convergência entre os dados do MAPA e do IBGE.

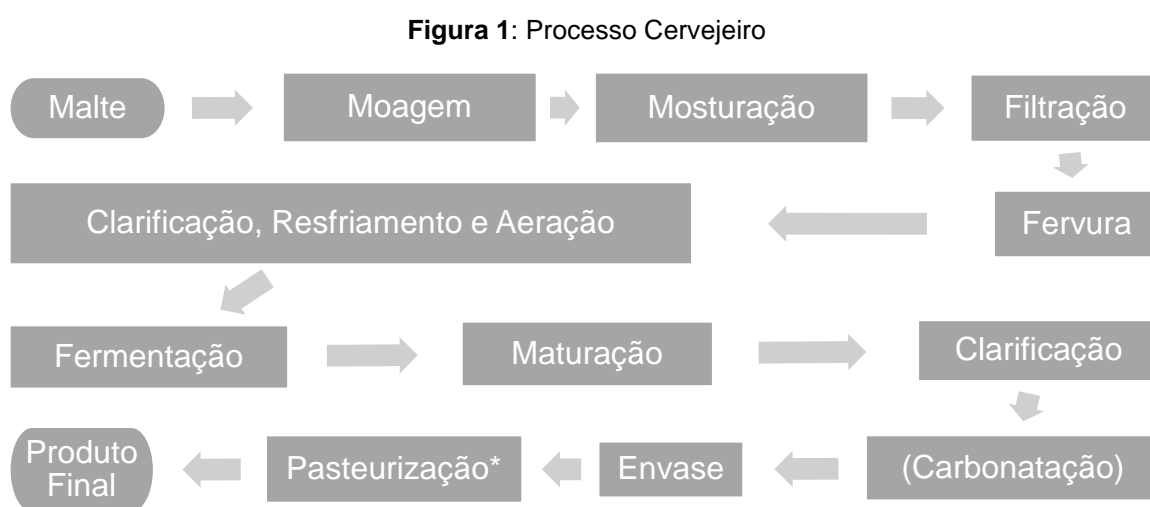
2.1.1. Legislação

Segundo o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, as bebidas podem ser classificadas em não alcoólicas e alcoólicas. Nesse contexto, a cerveja encontra-se dentro da classificação das bebidas alcoólicas fermentadas, visto que possui graduação alcoólica acima de 0,5 % em volume, a 20 °C e é obtida através de fermentação alcoólica. Além disso, sua definição na Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019 é dita como uma bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro. A classificação das cervejas pode ser segundo sua origem, concentração do seu extrato, cor, teor alcoólico, proporção de matérias primas e quanto a fermentação. Além disso, pode ser produzida pelo método clássico, em batelada, ou contínuo.

Sendo assim, várias são as características as quais uma cerveja pode adquirir de acordo com o processo e as características de preferência do consumidor, porém o que não mudará são os seus ingredientes obrigatórios: Água potável, Malte e Lúpulo.

2.1.2. Processamento

O processo de fabricação de cerveja está relacionado a uma série de etapas para a obtenção do produto final. Abaixo está ilustrado o fluxograma do processo cervejeiro.



Fonte: (AQUARONE et. al, 2001), (VENTURINI FILHO, 2016) (Adaptado)

Como ilustrado no Fluxograma 1, são várias as etapas pertinentes ao processo cervejeiro. Abaixo será descrito com mais detalhes acerca de cada uma das etapas principais:

- **Malte:** O malte consiste em um grão que passou pelo processo de germinação interrompido sob condições controladas. Para isso, inicialmente o grão passa por uma etapa inicial com a finalidade de hidratá-lo, para que adquira umidade ideal e seja capaz de produzir as enzimas envolvidas no processo de germinação e também tornar disponível para a ação enzimática as reservas amiláceas do endosperma que atuarão como fonte energética para a germinação. Quando as modificações do endosperma atingem um nível adequado, considerando o processo de germinação, o processo é interrompido e o malte deve passar por uma etapa de secagem a fim de preservar as enzimas que foram produzidas e serão úteis no processamento da cerveja

(BELTI; DUARTE; GEORG-KRAEMER, 2012) (MARTINS; RODRIGUES, 2015).

- Moagem: A partir do malte inicia-se a primeira etapa do processo, a moagem. Ela é realizada para que as partes do grão malteado sejam expostas a fim de que as enzimas tenham facilidade em acessar as partes amiláceas na etapa seguinte. Essa etapa inicial é de muita importância para o processo, pois ela influenciará a qualidade tecnológica das etapas seguintes, principalmente na mosturação, e, conseqüentemente, também influenciará na qualidade do produto final. Consiste em um processo mecânico de trituração, podendo ocorrer por duas vias: Moagem a seco ou Moagem úmida, onde, em ambas as vias, é essencial o cuidado com a granulometria e também com a casca, para que fique o mais intacta possível e facilite a filtração. (VENTURINI FILHO, 2016).
- Mosturação / Brassagem: Consiste na mistura dos grãos de malte moídos com água quente a uma temperatura que irá variar de acordo com a receita e objetivos do processo (KUNZE, 2004). É importante saber, no entanto, as temperaturas as quais as enzimas de interesse de atuação possuem sua atividade máxima a fim de que o correto binômio tempo vs. temperatura seja ajustado (VENTURINI FILHO, 2016). Sendo assim, o principal objetivo é produzir a maior quantidade de extrato possível pela conversão da fração amilácea em açúcares fermentáveis (KUNZE, 2004). Na tabela 1 abaixo, encontram-se as faixas de temperatura ótima das principais enzimas de interesse na produção da cerveja. Temperaturas mais brandas são ótimas para a ação das peptidases, transformando as proteínas em moléculas menores (aminoácidos), que são essenciais para o substrato da levedura. Porém, deve-se ter cuidado para que o tempo de permanência nessa temperatura não se exceda, visto que pode comprometer os parâmetros de qualidade relacionados a espuma do produto final, já que é formada por proteínas (KUNZE, 2004). Temperaturas mais elevadas são ótimas para a ação das amilases, a α -amilase quebra as cadeias de amido em açúcares não fermentáveis mais complexos (dextrinas) e a β -amilase quebra as cadeias de amido em açúcares fermentáveis (maltoses). Ambas são importantes, pois uma irá fornecer substrato para a etapa de fermentação e a outra contribuirá para o sabor

adocicado e o corpo da bebida (DE OLIVEIRA; DA SILVA, 2017). Ao final, ocorre o aquecimento com temperaturas altas de aproximadamente 80 °C com a finalidade de inativar as enzimas presentes (VENTURINI FILHO, 2016).

Tabela 1: Faixa de temperatura ótima de atuação das enzimas

Substrato	Enzima	Temperatura Ótima (°C)
Amido	α -amilase	70 – 75
Amido	β -amilase	60 – 65
Amido	Dextrinase	55 – 60
Proteína	Endopeptidases	50 – 60
Proteína	Exopeptidases	40 – 50
Hemicelulose	Hemicelulase (Xilanase)	40 – 45

Fonte: VENTURINI FILHO (2016).

- **Filtração:** Nessa etapa, o objetivo é separar o extrato aquoso da parte sólida insolúvel do malte, originando o mosto. A filtração é normalmente realizada em alta temperatura, para que o extrato tenha uma viscosidade que favoreça o processo e para diminuir as chances de contaminação. A parte sólida insolúvel do malte pode atuar como agente filtrante, e essa etapa do processo normalmente ocorre em duas partes: Primeiramente a fração líquida atravessa o agente filtrante, se transformando no mosto primário. Na sequência, o agente filtrante (resíduo sólido) é lavado com água a fim de recuperar o extrato do mosto que ficou retido após a separação do mosto primário. (AQUARONE et. al, 2001).
- **Fervura:** Após a filtração e adição do lúpulo, ocorre a fervura, com objetivo de inativação enzimática, esterilização do mosto, coagulação proteica, concentração do mosto pela evaporação da água e intensificação da cor e sabor do mosto pela extração dos compostos amargos e aromáticos do lúpulo (VENTURINI FILHO, 2016). A quantidade e o tipo de lúpulo adicionado vão influenciar no amargor do mosto e no sabor final da cerveja. Os diversos tipos de lúpulo podem ser adicionados todos de uma vez ou em diferentes momentos durante a etapa de fervura (VENTURINI FILHO, 2016). Tradicionalmente ele é adicionado em três etapas: Primeiramente, $\frac{1}{4}$ do peso total é feita após 15

minutos do início da ebulição, com a finalidade de ajudar na coagulação das proteínas. Após 30 minutos, $\frac{1}{2}$ do peso total é adicionada, com a finalidade de conferir o amargor. Por último, faltando 15 minutos para o final da etapa, pode ser adicionado um tipo de lúpulo de aroma mais fino, para elevar o padrão sensorial do produto final (AQUARONE et. al, 2001). O mosto permanece em fervura por aproximadamente 60 minutos, até atingir a concentração desejada de açúcar para o início da fermentação, podendo atingir uma evaporação máxima de até 10% do volume inicial (VENTURINI FILHO, 2016).

- Clarificação, Resfriamento e Aeração: Etapa intermediária entre a fervura e a fermentação. A clarificação tem como objetivo a retirada de precipitados formados na etapa anterior, como complexos de proteínas coaguladas e entre outros, a fim de diminuir a turbidez do mosto (VENTURINI FILHO, 2016). Na sequência, o resfriamento tem como objetivo diminuir a temperatura do mosto para a inoculação da levedura, essa etapa é realizada em trocadores de calor. Já a aeração é importante para que as leveduras da fermentação consigam atuar favoravelmente na etapa seguinte e o ar estéril ou oxigênio é inserido ao final do resfriamento ou em duas partes, uma parte no trocador de calor entre os estágios de resfriamento e o restante na linha do mosto já resfriada completamente, a fim de evitar o escurecimento do mosto por oxidação de alguns compostos presentes no mosto. (AQUARONE et. al, 2001).
- Fermentação (fermentação primária): A etapa de fermentação se inicia com o uso de culturas de leveduras frescas, liofilizadas ou renovadas após certo número de ciclos fermentativos (RUBIO-FLORES; SERNA-SALDIVAR, 2016), que são inoculadas junto ao mosto em reatores. O objetivo principal é a conversão de açúcares em etanol e gás carbônico sob condições anaeróbicas. Durante essa etapa também ocorre a produção de produtos orgânicos intermediários que contribuem para o flavor característico da cerveja (RUBIO-FLORES; SERNA-SALDIVAR, 2016). A cerveja pode ser de alta fermentação (Ale) ou de baixa fermentação (Lager) e os parâmetros de tempo e temperatura também variam de acordo com o tipo de fermentação usada da produção da cerveja. Para a cerveja tipo Ale, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais usada, além disso o processo ocorre em temperaturas mais elevadas (15 – 25 °C) e tem duração de tempo menor. Já na cerveja tipo Lager, são usadas as

leveduras *Saccharomyces uvarum* e *Saccharomyces pastorianus*, o processo ocorre em temperaturas menores e tem duração de tempo maior, quando comparado ao outro tipo. Ao final dessa etapa, a cerveja é chamada de “cerveja verde”. (AQUARONE et. al, 2001).

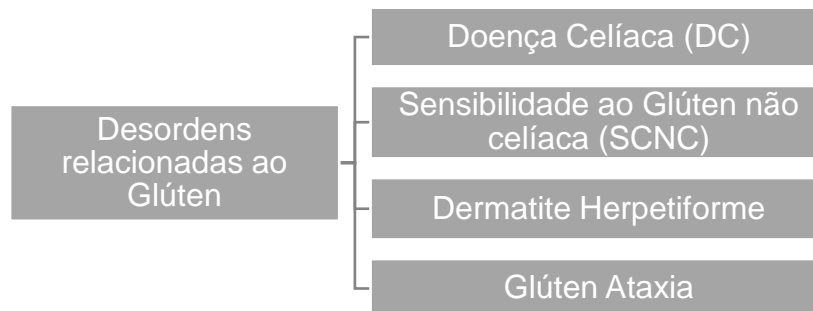
- **Maturação (fermentação secundária):** Período que pode variar de dias a meses com o objetivo de refinar as características de sabor e aroma da cerveja, iniciar a clarificação da cerveja por sedimentação, saturar a cerveja com gás carbônico e manter a cerveja no estado reduzido, a fim de evitar oxidações que comprometam a sua qualidade sensorial (AQUARONE et. al, 2001).
- **Clarificação:** Embora na maturação já ocorra uma diminuição considerável da turbidez por sedimentação, faz-se necessário uma etapa de clarificação para eliminar o restante da turbidez decorrente de partículas insolúvel, ela pode ser feita por técnicas de filtração, centrifugação, sedimentação ou uso de agentes clarificantes (VENTURINI FILHO, 2016).
- **Carbonatação:** A cerveja é naturalmente carbonatada pelo gás carbônico produzido pelas leveduras, porém podem ser usados os métodos mecânicos de carbonatação (AQUARONE et. al, 2001), visto que a sua concentração na cerveja deve ser controlada de forma a garantir o controle de qualidade do produto final (VENTURINI FILHO, 2016). Normalmente essa etapa é realizada durante a transferência da cerveja filtrada para o tanque de armazenamento final sob pressão que lá permanecerá até o momento do envase (AQUARONE et. al, 2001).
- **Envase:** Procedimento de engarrafamento, enlatamento ou embarrilamento do produto final.
- **Pasteurização*:** Etapa que pode ser realizada antes ou após o envase com o objetivo de conferir estabilidade biológica ao produto final. Quando é realizada antes do envase, é realizado em trocadores de calor e quando é realizada após o envase, ocorre em um túnel de pasteurização por aspersão de água. (AQUARONE et. al, 2001).

2.2 Glúten

Glúten é o nome dado ao conjunto de centenas de proteínas de reserva encontradas no endosperma de sementes de cereais (como o trigo, centeio, cevada) que são unidas por pontes dissulfetos. Essas proteínas de reserva são naturalmente ricas em prolina e glutamina, dois dos 20 aminoácidos essenciais ao homem (EMBRAPA, 2009) e são divididas em: Prolaminas e Gluteinas. As prolaminas são as partes proteicas presentes no glúten que apresentam toxicidade para pessoas celíacas, elas correspondem a aproximadamente 30 - 50 % da proteína do glúten (HOWARD *et al.*, 1996) e recebem denominações características de acordo com o grão de cereal, para o trigo, a nomenclatura usada é gliadina, para o centeio, secalina e, para a cevada, é hordeína. (YONAMINE; PINOTTI, 2021).

Pesquisadores desenvolveram nomenclaturas e classificações para melhor compreensão sobre as desordens relacionadas ao glúten (SAPONE *et al.*, 2012):

Figura 2: Desordens relacionadas ao glúten



Fonte: SAPONE *et al.*, 2012 (Adaptado)

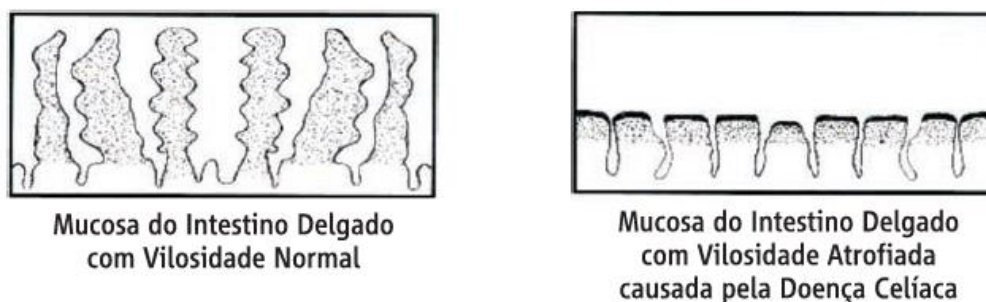
2.2.1. Doença Celíaca

Segundo a Celiac Disease Foundation, a doença celíaca (DC) é uma enteropatia autoimune que ocorre em pessoas geneticamente predispostas à sensibilidade ao glúten, porém fatores imunológicos e até ambientais contribuem para a manifestação dessa doença, embora ainda não se tenham estudos sobre os seus mecanismos de influência (SDEPANIAN; DE MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999).

Segundo a ACELBRA (Associação dos Celíacos do Brasil), essa doença geralmente se manifesta na infância, entre o primeiro e o terceiro ano de vida, mas pode, entretanto, surgir em qualquer idade, inclusive na adulta. A sua principal

característica é o aparecimento de alterações na mucosa do intestino delgado, com atrofia subtotal e achatamento das vilosidades intestinais (SDEPANIAN; DE MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999). Como consequência tem-se a má absorção de nutrientes pelo intestino delgado, podendo evoluir para diversas outras manifestações clínicas de acordo com a resposta imunológica do corpo (GAMA E SILVA; FURLANETTO, 2010).

Figura 3: Comparação entre as vilosidades da mucosa do intestino delgado



Fonte: Guia Orientador para Celíacos, 2010.

SINGH *et al.* (2018), em sua pesquisa sobre a prevalência global da doença celíaca, constatou que a prevalência da DC no âmbito global é de 1,4 % com base em exame sorológico e 0,7 % com base em biópsias realizadas. Além disso, a menor prevalência foi observada na América do Sul (0,4 %), seguida da África e América do Norte (0,5 %), Ásia (0,6 %) e a maior prevalência foi observada na Europa e Oceania (0,8 %) dados esses com base nos resultados de biópsia. A diferença de prevalência da DC entre os continentes provavelmente ocorre devido a questões genéticas e ambientais, como o padrão de dieta de cada continente e propensões a doenças gastrointestinais. Segundo o Guia Orientador para Celíacos, desenvolvido pela FENACELBRA (Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil), o diagnóstico é feito através da realização de um exame sorológico para a doença celíaca e também pela biópsia do intestino delgado através da visualização por microscopia das vilosidades do intestino.

O principal tratamento para a doença celíaca é através da modificação dos hábitos alimentares pela inserção de uma dieta isenta de glúten (ARAÚJO *et al.*, 2010) a fim de que as vilosidades intestinais sejam revertidas à normalidade (SDEPANIAN; DE MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999). Para isso, é essencial que as pessoas portadoras da DC saibam identificar corretamente os alimentos permitidos e proibidos

para o consumo através da leitura dos rótulos, com o entendimento sobre os ingredientes seguros para o seu consumo. No entanto, GUTOWSKI *et al.*, (2020) constatou, em seu estudo sobre a identificação de produtos sem glúten por pacientes celíacos, que as pessoas não são capazes de identificar de forma correta e consistente a presença de glúten em alimentos somente com base nas informações sobre o produto disponíveis no rótulo, principalmente quando não é indicado explicitamente a presença/ausência de glúten de maneira escrita e clara para os consumidores.

Considerando as necessidades dos portadores da doença celíaca em relação as informações sobre os alimentos seguros ou não para seu consumo, no Brasil existe a Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003 que prevê a obrigatoriedade da informação sobre a presença de glúten em produtos alimentícios industrializados. Além disso, foi aprovada a RDC nº 26, de 2 de julho de 2015 que dispõe sobre os requisitos para a rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares, estando inclusos, entre os alimentos contemplados nessa RDC, aqueles que contém glúten (cevada, centeio, trigo). No rótulo, as informações sobre os alergênicos devem estar após ou logo abaixo da lista de ingredientes, em caixa alta, negrito, tamanho nunca inferior à letra usada na lista de ingredientes, porém com altura mínima de 2 mm e, além disso, deve estar em cor contrastante com o fundo do rótulo.

2.3 Enzimas

As enzimas são proteínas que atuam como biocatalisadores, ou seja, aceleram a velocidade de reações e, além disso, exibem seletividade sobre substratos (DAMODARAN; PARKIN, 2010), sendo classificadas segundo as reações que catalisam e substratos sobre as quais irão agir (NELSON; COX, 2014). Segundo a AGEITEC (Agência Embrapa de Informação Tecnológica), elas podem ser encontradas na natureza de forma espontânea em todos os tipos de células, podendo ser separadas em enzimas microbianas, enzimas de origem animal e enzimas de origem vegetal. Além disso, são usadas de maneira não intencional desde a antiguidade na produção de produtos alimentícios (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Com avanço tecnológico, foi possível a produção de enzimas em escala industrial, sendo possível obtê-las com maior grau de pureza, torna-las mais específicas e adaptá-las para as condições de processo as quais se deseja usar (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002). Atualmente, a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) e a IUMBM (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) estabeleceram a NC - IUMBM (Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) que divide as enzimas em sete classes principais de acordo com sua função, estabelecendo a nomenclatura das enzimas (E.C. – Enzyme Nomenclature):

Tabela 2: Sistema de classificação das enzimas

Classe	Função	Enzimas
Oxidoredutases (E.C. 1)	Catalisar reações de oxirredução com transferência de elétrons.	Oxidases, Desidrogenases
Transferases (E.C. 2)	Catalisar reações de transferência de grupos funcionais.	Transaminases e Quinases
Hidrolases (E.C. 3)	Catalisar hidrólise de ligações covalentes.	Peptidases
Liases (E.C. 4)	Catalisar a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.	Descarboxilases e Dehidratases
Isomerases (E.C. 5)	Catalisar mudanças dentro de uma única molécula e a interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos.	Epimerases
Ligases (E.C. 6)	Catalisar reações de formação de novas moléculas.	Sintetases e Carboxilases
Translocases (E.C. 7)	Catalisar o movimento de íons e moléculas através das membranas ou sua separação dentro delas.	ADP / ATP translocase, ...

Fonte: NC - IUMBM.

Sendo assim, as enzimas possuem diversas classificações, podendo ser usadas em diferentes setores, inclusive no setor alimentício principalmente nas áreas de álcool e derivados, amidos e açúcares, cervejarias, laticínios e derivados, panificação, vinicultura e sucos de frutas.

2.3.1 *Proteases*

As proteases ou enzimas proteolíticas, fazem parte da classe hidrolases segundo a NC – IUBMB e catalisam a hidrólise de ligações peptídicas entre os aminoácidos e as proteínas. Elas podem ser classificadas como: enzimas exógenas ou enzimas endógenas. As enzimas exógenas são adicionadas aos alimentos de acordo com sua funcionalidade, estabilidade e seletividade a fim de causar uma mudança desejável, e as enzimas endógenas, no entanto, são aquelas presentes na matriz do alimento, podendo ser responsáveis por reações que irão favorecer e melhorar as características e qualidade, ou então elas podem ser responsáveis por reações que irão piorar esses aspectos nos alimentos (DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Existem ainda diversas outras classificações que podem ser dadas às proteases, como de acordo com a estrutura do seu sítio ativo, que definirá a especificidade do substrato pela enzima, de acordo com o pH, que determinará as condições de acidez e alcalinidade que são ideais e também de acordo com o seu local de ação, que indicará em quais posições ocorrerá a clivagem das ligações peptídicas (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2018).

No início dos estudos de obtenção e aplicabilidade das proteases, elas eram adquiridas de fontes vegetais e animais. Porém, atualmente a sua grande maioria é obtida através dos microrganismos, sendo possível a produção em larga escala através de processos fermentativos em biorreatores (GURUMALLESH *et al.*, 2019). Segundo KUMARI *et al.* (2015) citado por GURUMALLESH *et al.* (2019), cerca de 60 % das enzimas no mercado global são proteases e elas possuem ampla aplicação no setor alimentício, uma vez que são capazes de promover modificações altamente específicas e seletivas nas proteínas (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2018).

Entre as aplicações na indústria de alimentos, alguns exemplos são: processo de produção do queijo para hidrolisar as caseínas, também podem ser usadas para o

amaciamento de carnes e entre outros. Além disso, recentemente, as proteases estão tendo alta aplicabilidade na obtenção de produtos sem glúten, já que possuem grau alimentício na obtenção, sendo seguros para aplicação em alimentos, além disso são estáveis e apresentam atividade de acordo com as condições do meio, possuem custo benefício que permitem seu uso tecnológico e são aceitas e benéficas pelo público consumidor (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018).

2.4 Cerveja sem glúten

Segundo a Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, a expressão “Cerveja sem glúten” refere-se a cerveja elaborada com cereais não fornecedores de glúten, ou que contenha teor de glúten abaixo do estabelecido em regulamento técnico específico. Embora na legislação brasileira se faça a menção de um regulamento técnico específico, ele ainda não existe, no âmbito do território nacional.

A determinação do teor mínimo de glúten aceito nos alimentos é constantemente revisada por outros países e existem divergências entre diferentes localidades, podendo variar de 10 mg glúten / kg (10 ppm) até 200 mg de glúten / kg (200 ppm). Sendo assim, muitas empresas brasileiras têm como referência as regras estabelecidas pelas Codex Alimentarius, que consiste em uma série de padrões e diretrizes criados pela FAO (Food and Agriculture Organization) em conjunto com a WHO (World Health Organization) visando proteger a saúde do consumidor e a qualidade do produto.

Segundo o *standard for food for special dietary use for persons intolerante to gluten* do Codex Alimentarius (2008), para um produto ser considerado sem glúten ele não deve exceder o teor de 20 ppm e para ser considerado com baixo teor de glúten, ele deve ter até 100 ppm. A determinação quantitativa de glúten em alimentos ou ingredientes deve ser baseada em um método imunológico (ou outro método que forneça pelo menos igual sensibilidade e especificidade) e o limite de detecção deve ser de pelo menos 10 mg de glúten / kg (10 ppm).

De acordo com CATASSI *et al.* (2007), a divergência entre as localidades ocorre pois não é considerada somente a dose mínima do alimento para apresentar efeitos negativos aos intolerantes ao glúten, mas também a quantidade de produtos sem glúten que são consumidos, podendo variar de acordo com os hábitos

alimentares e disponibilidade de produtos de cada região no mundo. O estudo realizado por CATASSI *et al.* (2007), no entanto, conclui que um limite de 20 ppm é um teor médio adequado, havendo, ainda, nesse valor uma margem de segurança para sensibilidade ao glúten. Essa conclusão está de acordo com o valor estabelecido pelo Codex Alimentarius.

ARAÚJO *et al.* (2010) afirma em seu estudo que os hábitos alimentares estão diretamente envolvidos com o sentimento dos indivíduos. Situações como viajar, alimentar-se fora do lar e relacionar-se com amigos e familiares em eventos sociais podem representar problemas para os celíacos e causar certo desconforto, afetando as suas relações interpessoais, vínculos sociais e estilo de vida, visto que uma dieta sem glúten implica em novas práticas alimentares não habituais às pessoas em geral.

Considerando que, como já foi mencionado anteriormente, os dados da POF indicam que o consumo médio geral de cerveja aumentou, com destaque para o consumo médio de cerveja entre o gênero feminino, que dobrou e, além disso, SINGH *et al.* (2018) constatou em sua pesquisa que a doença celíaca é 1,5 vezes mais comum em mulheres do que em homens, já é uma realidade e necessidade de estudos sobre a cerveja sem glúten, visando atender a parcela da população com distúrbios relacionados a ingestão de glúten, que vêm sendo cada vez mais entendida e diagnosticada, a fim de que seus estilos de vida e vínculos sociais sejam afetados minimamente.

2.4.1 Métodos de quantificação de glúten na cerveja

O *standard for food for special dietary use for persons intolerante to gluten* do Codex Alimentarius (2008) determina que a quantificação de glúten deve ser baseada em um método imunológico, sendo recomendado o uso do método ELISA-R5, ou outro com pelo menos igual sensibilidade (10 ppm) e especificidade. Atualmente, existem diversas metodologias para quantificar o glúten na cerveja: Métodos ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), LC-MS (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas) e métodos baseados em técnicas de PCR.

Os métodos ELISA podem ser diretos, indiretos, competitivos ou sanduíche e se baseiam em ensaios imunoenzimáticos (reações entre antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas). Os métodos competitivos e sanduíche

são os mais usados para detecção de glúten em cerveja, ambos oferecem a vantagem de possuírem baixo custo, quando comparados aos outros métodos de quantificação de glúten e oferecem limites de detecção e quantificação adequados para fins de classificar um produto como “sem glúten” de acordo com as normas estabelecidas pelo *Codex Alimentarius*.

O método ELISA sanduíche, é recomendado pelo *Codex Alimentarius*, também é aprovado pela AACC (Associação Americana de Químicos de Cereais) e pela AOAC (Associação de Químicos Analíticos Oficiais). Esse tipo de método não é capaz de quantificar com precisão o glúten em alimentos fermentados e hidrolisados, como a cerveja. Ele requer o uso de dois epítopos (porção que se liga) para a detecção e são apropriados apenas para a detecção de glúten intacto. Seu limite de detecção é de aproximadamente 1 ppm de glúten (podendo variar de acordo com o tipo de prolamina) e o seu limite de quantificação é de 5 ppm (FIEDLER *et al.*, 2019).

O método competitivo, além de ser recomendado pelo *Codex Alimentarius*, aprovado pela AACC (Associação Americana de Químicos de Cereais) e pela AOAC (Associação de Químicos Analíticos Oficiais), também é aprovado pela ASBC (Sociedade Americana de Químicos Cervejeiros). Ele usa um anticorpo monoclonal R5 capaz de reconhecer sequências peptídicas potencialmente tóxicas ricas em prolina e glutamina (constituintes das prolaminas), principalmente QQPFP (glutamina-glutamina-prolina-fenilalanina-prolina) sendo necessário somente o uso de um epítipo (porção que se liga) (SILVA, 2010). Essa metodologia permite a detecção de peptídeos parcialmente hidrolisados, que ainda podem ser potencialmente tóxicos para indivíduos celíacos. Seu limite de detecção é de aproximadamente 5 ppm de glúten (podendo variar de acordo com o tipo de prolamina) e o seu limite de quantificação é de 10 ppm (LAUREANO, 2010).

Ambos os métodos fazem uma estimativa do teor de glúten a partir dos níveis de prolamina, por isso poderão apresentar variações, visto que, por exemplo, o método competitivo também detecta peptídeos parcialmente hidrolisados (GUERDRUM; BAMFORTH, 2011).

A LC-MS é uma técnica analítica que combina a cromatografia líquida com a espectrometria de massas, sendo muito usada para analisar compostos. Pode ser usada para detecção e caracterização do glúten e a metodologia consiste na digestão da proteína para que os peptídeos sejam analisados no equipamento. Sendo assim,

os espectros formados incluirão os peptídeos presentes, sendo possível o seu reconhecimento. Além disso, essa técnica é muito usada quando os teores de glúten atingem valores inferiores aos detectáveis através dos métodos ELISA e quando se deseja conhecer todos os peptídeos presentes na amostra (FIEDLER *et al.*, 2019).

Os métodos baseados em técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction), consistem na extração do DNA da amostra de interesse para que o gene específico causador da toxicidade seja identificado, por isso apresenta alta complexidade e especificidade. Por ser um método que requer custo elevado e equipamentos especiais, é pouco usado e recomenda-se que essa técnica seja usada em casos pontuais e confirmatórios dos testes ELISA (MACHADO, 2012).

3 METODOLOGIA

Esse trabalho é uma revisão da literatura que abordará as particularidades referentes ao desenvolvimento de uma cerveja sem glúten. Já é de conhecimento geral, que diversas são as metodologias para a obtenção de um produto com essa característica, tais como uso de cereais ou pseudocereais naturalmente sem glúten como matéria prima ou então o uso de malte de cevada em conjunto com o uso de tecnologias que eliminem o glúten, como o uso de enzimas exógenas e uso de agentes precipitantes da proteína (HAGER *et al.*, 2014)

Sendo assim, na presente revisão será abordado a produção de cerveja sem glúten a partir do uso de malte de cevada com aplicação de enzimas exógenas. Para isso, foram avaliados artigos com as seguintes palavras chave: Gluten free beer, beer, peptidase treatment, barley, malt nas seguintes bases de dados: Science Direct e SciELO, sem restrição de data de publicação. Também foram avaliados artigos disponibilizados através da base de dados Google Acadêmico de 2016 até 2021 com as seguintes palavras chave: gluten, free, barley, malt, beer. Além disso, foi restringido a obrigatoriedade de conter a frase exata “gluten free beer” em qualquer lugar do artigo. Foram procurados artigos em português e inglês.

4 CERVEJA SEM GLÚTEN POR APLICAÇÃO ENZIMÁTICA

A cerveja, nos últimos anos, vem sendo cada vez mais evidenciada devido as diversas possibilidades de processamento as quais possibilitam a obtenção de cervejas artesanais e diferenciadas. A maioria delas, no entanto, ainda é produzida majoritariamente com malte de cevada, indo ao encontro com as tradições e características inerentes a sua fabricação desde a antiguidade.

A impossibilidade de consumo de cerveja por indivíduos celíacos é, por vezes, questionada, visto que ocorrem diversas etapas, desde o processo de maltagem até etapas do processamento da cerveja, que podem causar modificações no teor de glúten. Além disso, diversas cervejas comercialmente disponíveis acabam incorporando adjuntos cervejeiros que não possuem glúten e essa adição pode acabar “diluindo” o teor inicial de glúten (GUERDRUM; BAMFORTH, 2011).

GUERDRUM e BAMFORTH (2011) em seu estudo sobre os níveis de gliadina em 28 cervejas disponíveis comercialmente e de tipos variados obtiveram como resultado que os maiores teores de gliadina foram encontrados em cervejas onde o trigo é o principal ingrediente, conclusão que já era esperada, visto que a gliadina é a denominação característica da prolamina presente no trigo. Já as cervejas onde a cevada é o principal ingrediente, foram obtidos níveis relativamente baixos de gliadina. Considerando que o teste usado é capaz de reconhecer a gliadina, mas também reconhece algumas proteínas relacionadas do centeio e da cevada e que as prolaminas correspondem a aproximadamente 50 % da proteína do glúten, embora possa haver variações nessa porcentagem resultando em um valor superestimado ou subestimado do teor de glúten, os autores concluíram que, do total de cervejas testadas somente 10 das 28 cervejas continham menos de 20 ppm de glúten e dessas 10, 3 eram sem glúten, por isso já era um resultado esperado para elas.

Sendo assim, embora as proteínas do glúten tenham baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, possam ser mais facilmente removidas por filtração, a presença delas no produto final ainda existe (COLGRAVE *et al.*, 2013). Também é importante considerar que provavelmente o indivíduo não consumirá somente uma unidade do produto e que existem variações entre os indivíduos celíacos a respeito do nível de glúten que pode ser ingerido até os efeitos da doença sejam perceptíveis.

Segundo EHREN *et al.* (2009), citado por GURUMALLESH *et al.* (2019) uma ampla variedade de proteases provenientes de vegetais, especialmente cereais contendo glúten (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018), ou microrganismos, como fungos do gênero *Aspergillus* (*A. flavus* var. *oryzae* (AO) e *A. niger* (AN)) e algumas bactérias (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018), podem ser usada na degradação do glúten e estão sendo aplicadas na indústria cervejeira. A prolil endopeptidase, classe EC 3.4.21.26, é uma protease que exibe atividade de clivagem pós prolina e é capaz de degradar os peptídeos e as proteínas do glúten intactas de forma eficiente (MITEA *et al.*, 2008). Além disso, as endopeptidases são mais eficazes na degradação do glúten visto que atuam entre as cadeias polipeptídicas, diferente das exopeptidases, que atuam somente perto das extremidades (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018).

KNORR; WIESER; KOEHLER (2016) avaliou o uso de uma preparação de peptidase obtida comercialmente (DSM Food Specialties B.V.), a prolil endopeptidase de *A. niger* (AN-PEP), específica para a prolina. O mosto foi produzido sob o seguinte perfil de temperatura:

Tabela 3: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação

Temperatura	Tempo
55 °C	5 min
64 °C	30 min
73 °C	30 min
75 °C	10 min

Fonte: KNORR; WIESER; KOEHLER (2016) (Adaptado)

Após, foi realizada a filtração e fervura com adição de lúpulo por 90 min. Na sequência foi realizada a retirada do precipitado formado durante a fervura (*hot trub*) e o resfriamento. Por fim, foi realizada a fermentação (10 °C por 7 dias), maturação (4 °C por 28 dias). A diferença para a cerveja controle é que houve adição de AN-PEP (0,08 g/hL mosto) no início e após a fermentação. Somente para a comparação dos parâmetros de qualidade, as cervejas passaram por um processo final de filtração com terra diatomácea e como resultado, obtiveram valores próximos em todos os parâmetros comparados, porém, não foi realizada análise estatística para verificar a

sua real similaridade. Para os parâmetros de espuma, os resultados obtidos também foram semelhantes: A formação de espuma foi linear e após 5 min, foi alcançado um nível de espuma máximo. Após 30 min, 60 % da espuma ainda estava estável, comprovando que a aplicação da peptidase não trouxe efeitos negativos para a formação da espuma. Por fim, foi realizada uma análise sensorial com 26 – 38 provadores comparando a cerveja padrão e a cerveja tratada com AN-PEP com uma cerveja sem glúten com malte de painço (Millet) obtida comercialmente, através de um teste triangular, teste de aceitação de 5 pontos onde foram avaliados os atributos de odor, sabor, corpo e amargor e, por fim, teste de preferência. Em relação ao teste triangular, foi percebida diferença de ambas as cervejas (padrão e AN-PEP) quando comparado com a cerveja comercial. Isso se confirmou também no teste de aceitação, a cerveja padrão obteve os melhores resultados em relação a todos os atributos, seguido pela cerveja tratada com AN-PEP e por último, a menos aceita, foi a cerveja obtida comercialmente. No teste de preferência, o resultado seguiu o mesmo comportamento do teste anterior: 1º lugar – Cerveja padrão, 2º lugar – Cerveja com AN-PEP; e, por último, Cerveja obtida comercialmente. Quanto ao teor de glúten, foram analisadas amostras durante o processo de fermentação, maturação, filtração e no produto final. A cerveja tratada com AN-PEP não teve diminuição no seu teor de glúten ao final do processo fermentativo, a diminuição significativa somente ocorreu após a adição da segunda parte do preparado enzimático, no início da etapa de maturação, de modo que não houve detecção de glúten ao final dessa etapa (limite de detecção: 10 ppm). Já cerveja padrão, sem tratamento algum para diminuição de glúten, obteve um teor de 86 ppm para o produto final. Sendo assim, a cerveja tratada com AN-PEP representa uma alternativa favorável para o processamento de cerveja a partir de malte de cevada com a finalidade de obter um produto final sem glúten, segundo as normas previstas pelo *Codex Alimentarius* (2008) e, além disso, obteve características de qualidade e aceitação favoráveis, sendo ambas caracterizadas como cervejas de baixa fermentação, forte (14 °P), escuras (EBC = 29), com alto teor alcoólico (6 %) e com perfil aromático mais forte pra o caramelo e mel e malte.

DI GHIONNO *et al.* (2017) também avaliou o uso da AN-PEP, com o objetivo de atingir um teor de glúten inferior a 10 ppm sem que os atributos de qualidade e as características sensoriais do produto sejam afetadas para uma cerveja American Pale

Ale. A cerveja produzida em escala piloto e o mosto seguiu o seguinte perfil de temperatura:

Tabela 4: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação para cerveja American Pale Ale

Temperatura	Tempo
52 °C	20 min
65 °C	60 min
72 °C	30 min
78 °C	15 min

Fonte: DI GHIONNO *et al.* (2017) (Adaptado)

Após a mosturação, foi realizada uma filtração e, na sequência, a adição de lúpulo para a etapa de fervura, que durou 60 min. Na sequência, foi realizada a retirada do precipitado formado durante a fervura, resfriamento e aeração. Por fim, foi realizada a fermentação a 20 °C e a maturação (1 °C por 9 dias). A diferença para a cerveja controle é que houve adição de AN-PEP obtida comercialmente (DSM Food Specialties B.V.) no início da etapa de fermentação. A concentração adicionada foi de 3,5 g/hL, 0,5 g/hL a mais do que a dosagem máxima recomendada pelo fabricante para o aumento da estabilidade da cerveja, com o objetivo de atingir a redução desejada no teor de glúten. Em relação aos parâmetros de qualidade, não foram obtidas diferenças significativas entre os parâmetros do controle e da cerveja com AN-PEP, exceto para a turbidez, que apresentou um valor aproximadamente 43 % menor que o padrão, e para a estabilidade da espuma, que obteve um valor aproximadamente 17 % menor que o padrão. A redução da turbidez foi um resultado favorável, provavelmente ocorrido pois as proteínas que acabam causando a turbidez também foram afetadas pela ação enzimática, já a diminuição da estabilidade da espuma, não é um resultado favorável, pois esse é um atributo importante e de qualidade na cerveja, porém, mesmo ainda que tenha apresentado diminuição, seu resultado ainda foi considerado satisfatório e não prejudicial à qualidade do produto final. Em relação ao teor de glúten do produto final, foi observada uma diminuição de mais de 97 %, quando comparado com o teor obtido no padrão, resultando em uma cerveja com aproximadamente 3 ppm de glúten. Por fim, foi realizado um teste triangular com 24 provadores comparando a cerveja padrão e a tratada com o

preparado enzimático. Ao nível de significância de 5 %, não foi percebida diferença significativa entre as amostras.

Ainda, DI GHIONNO *et al.* (2017) avaliou o uso da AN-PEP na produção de uma cerveja Stout, que passou pelas mesmas condições de processamento e de aplicação de AN-PEP que a cerveja American Pale Ale produzida, porém teve o seguinte perfil de temperatura na etapa de mosturação:

Tabela 5: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação para cerveja Stout

Temperatura	Tempo
68 °C	60 min
76 °C	70 min

Fonte: DI GHIONNO *et al.* (2017) (Adaptado)

Em relação ao teor de glúten do produto final, foi observada uma diminuição de mais de 91 %, quando comparado com o teor obtido no padrão, resultando em uma cerveja com aproximadamente 3 ppm de glúten. O teor de glúten na cerveja controle Stout, no entanto, foi menor do que o da cerveja controle American Pale Ale, provavelmente devido ao uso de outras variedades de maltes, lúpulo e levedura na cerveja Stout, a fim de atingir as características adequadas para o produto. Em relação aos parâmetros de qualidade, assim como na comparação da cerveja American Pale Ale controle e com adição de AN-PEP, para a comparação da cerveja Stout não foram obtidas diferenças significativas, exceto para a turbidez, que apresentou um valor aproximadamente 52 % menor que o controle, e para a estabilidade da espuma, que obteve um valor aproximadamente 15 % menor quando comparada com o controle. Por fim, no teste triangular comparando a cerveja Stout tratada com o preparado enzimático com o seu respectivo padrão, ao nível de significância de 5 %, não foi percebida diferença significativa entre as amostras.

Por isso, assim como o estudo realizado por KNORR; WIESER; KOEHLER, (2016), a aplicação de AN-PEP mostrou resultados favoráveis para a obtenção de um produto sem glúten, sem precisar realizar duas aplicações AN-PEP durante o processo, porém usando uma concentração quase 43 vezes maior.

SHETTY *et al.* (2017), no entanto, diferentes dos autores citados acima, desenvolveu um estudo para explorar e a caracterizar uma nova prolil peptidase (PEP)

de *Sphaerobacter thermophiles*, escolhida através de uma triagem no banco de dados UniProt usando critérios de termoestabilidade e tolerância na faixa de pH de interesse para aplicação. Ela foi expressada e sintetizada através da *E.Coli* DE3 (obtida comercialmente) através de processos genéticos de clonagem, para o uso durante a etapa de mosturação no processamento da cerveja. Antes da aplicação, foram realizados estudos de pH e temperatura ótima, sendo observada maior atividade enzimática para o pH 6,6, no entanto bons resultados também foram obtidos na faixa de pH da etapa de mosturação (5,6 – 5,8). A temperatura ótima observada foi de 63 °C, porém bons resultados em relação a atividade enzimática e também estabilidade operacional foram obtidos na faixa de temperatura de 50 a 65 °C.

A solução enzimática de PEP (8,77 U/mL) foi testada em duas proporções diferentes (Malte:PEP) na etapa de mosturação: 1:1 e 1:0,5, com o seguinte perfil de temperatura:

Tabela 6: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação

Temperatura	Tempo
54 °C	30 min
64 °C	60 min
80 °C	10 min

Fonte: SHETTY *et al.* (2017) (Adaptado)

Na sequência, as amostras passaram pela etapa de filtração e fervura. Na amostra controle, foram seguidos os mesmos procedimentos, porém sem a adição da PEP. Como resultado, foi obtida uma redução no teor de glúten de aproximadamente 70 % para a proporção malte:PEP 1:1 e uma redução de aproximadamente 58 % para a proporção 1:0,5, quando comparado com o controle (570 ppm de glúten). Esses resultados não atingiram os valores esperados para que uma cerveja possa ser denominada “sem glúten” ou com “baixo teor de glúten”, mas confirmam a capacidade de degradação do glúten sob as condições realizadas e também incentivam novos estudos com concentrações e proporções diferentes, representando uma alternativa ao uso da prolil endopeptidase de *A. niger* a ser explorada em trabalhos futuros.

FANARI *et al.* (2018), em seu estudo sobre a produção de cervejas artesanais sem glúten, também testou a aplicação de AN-PEP, através da tentativa de produção

em escala piloto de uma cerveja American India Pale Ale sem glúten. O mosto foi produzido com 25 kg de malte, 75 L de água e 28 g de sulfato de cálcio, seguindo o seguinte perfil de temperatura:

Tabela 7: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação

Temperatura	Tempo
68 °C	60 min
78 °C	10 min

Fonte: FANARI *et al.* (2018) (Adaptado)

Após, foi adicionada água a 78 °C até atingir um volume total de 130 L de mosto. Na sequência, houve a etapa de fervura, onde foi adicionado 80 g de lúpulo ao início e 10 g de um *blend* de nutrientes, que consiste em uma mistura de vitaminas, minerais e micronutrientes para auxiliar as leveduras na etapa de fermentação, 10 min antes do final dessa etapa. Ainda com a temperatura elevada, foi realizada a retirada do precipitado formado durante a fervura e adição de mais 300 g de lúpulo, para fins de aromaticidade. Por fim, foi realizada a fermentação (19 °C por 7 dias), maturação (4 °C por 14 dias) e refermentação da cerveja maturada (22 °C por 14 dias) com adição de 6 g/L de glicose e 0,05 g/L de levedura para a obtenção do produto final. A diferença para a cerveja controle é que houve adição de AN-PEP (4 mL/hL obtida comercialmente (DSM Food Specialties B.V.) no início da etapa de fermentação. Nenhum tratamento de estabilização (filtração ou pasteurização) foi realizado. Em relação aos parâmetros de qualidade, a cerveja com aplicação de AN-PEP apresentou maior % (v/v) de etanol quando comparado ao padrão, provavelmente devido a ação da peptidase que liberou aminoácidos e peptídeos no mosto que podem aumentar o desempenho da fermentação. Para o pH e parâmetro de cor, não houve diferença estatística entre as ambas. Para a turbidez houve diminuição, quando comparado ao padrão, assim como foi o resultado obtido por DI GHIONNO *et al.* (2017) e, para a turbidez temporária (Chill-haze), realizada a temperaturas baixas, houve diminuição de aproximadamente 76 % quando comparado ao padrão, esse fenômeno ocorre devido a interações entre os peptídeos e os polifenóis e a diminuição ocorreu pois a ação enzimática atuou nesses peptídeos. Foi observado uma diminuição de aproximadamente 20 % na estabilidade da espuma, quando comparado com o

padrão, esse resultado também foi obtido por DI GHIONNO *et al.* (2017) e está diretamente relacionado com o teor e tipo de proteínas no produto, embora as que estejam envolvidas nesse processo não sejam as que estão diretamente relacionadas ao glúten. Por fim, foi realizado um teste triangular com 25 provadores comparando a cerveja padrão com a tratada com AN-PEP e, ao nível de 5 % de significância, não foi percebida diferença significativa entre as amostras. Quanto ao teor de glúten, ao final da etapa de fermentação, foi obtido um teor de glúten de 120 ppm para a cerveja padrão e 21 ppm para a cerveja com AN-PEP, havendo, então, uma diferença de aproximadamente 82 % e, ao final da etapa de maturação, houve uma diferença de 96 % no teor de glúten, quando comparada a cerveja padrão e a cerveja com AN-PEP. Em relação ao produto final, foi obtido um teor de glúten de 62 ppm para a cerveja padrão e 2 ppm para a cerveja onde foi aplicado o tratamento enzimático, havendo uma diferença de aproximadamente 96 %. Logo, assim como os estudos realizados por KNORR; WIESER; KOEHLER (2016), também foi possível obter um produto final sem glúten com a adição do preparado enzimático AN-PEP, porém, no presente estudo, somente com a adição do preparado enzimático na primeira etapa de fermentação foi possível obter o objetivo almejado para o produto final, com uma diminuição de 1082 ppm de glúten (teor antes da etapa de fermentação) para 2 ppm.

FIEDLER *et al.* (2019), em seu estudo, testou o efeito de 3 diferentes concentrações de AN-PEP para a produção de cerveja sem glúten em escala piloto usando um malte base claro. Além disso, também foi avaliado o efeito da etapa final de filtração com terra diatomácea e perlita para a quantidade de glúten no produto final. A etapa de mosturação iniciou a 49 °C e teve fim ao atingir 76,7 °C. Após, ocorreu a filtração e a fervura, onde foi adicionado o lúpulo. Na sequência, foi realizada a retirada do precipitado formado durante a fervura e resfriamento. Por fim, foi realizada a fermentação (20 °C por 12 dias), maturação (4 °C por 8,5 semanas – 59,5 dias) e filtração com uma mistura de terra diatomácea a perlita para a clarificação do produto final. Foram produzidos 4 tipos de cervejas, a diferença entre elas foi a concentração de AN-PEP, obtida comercialmente (DSM Food Specialties B.V.), que foi adicionada junto à etapa de fermentação: 0 mL/hL (controle), 1,7 mL/hL (meia dose de PEP), 3,4 mL/hL (dose completa de PEP, conforme recomendado pelo fabricante) e 6,8 mL/hL (dose dupla de PEP). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os teores de glúten iniciais e das medidas ao longo do processo foram diferentes para cada um

deles. Ainda assim, foi possível observar que, independente da concentração de AN-PEP adicionada, o teor de glúten ficou acima de 20 ppm para todas elas após a etapa de fermentação. Ao longo da etapa de maturação, no entanto, o teor de glúten foi diminuindo, chegando a atingir teores abaixo de 20 ppm antes do tempo final de maturação para alguns ensaios. Ao final, todas as amostras, independente das concentrações de AN-PEP, obtiveram teor de glúten até 20 ppm para os ensaios 1 e 2 da triplicata. E, após a filtração com terra diatomácea e perlita, todas as amostras de todos os ensaios atingiram o limite de detecção do método usado (5 ppm), exceto para o controle, que obteve valores maiores, porém ainda dentro do limite para considerar o produto final sem glúten. Sendo assim, embora a triplicata tenha atingido valores diferentes, teores de glúten até 20 ppm já foram observados entre a segunda e terceira semana de maturação (total de 8,5 semanas) independentemente da concentração de AN-PEP e considerando também o controle. Além disso, a etapa final de filtração reduziu significativamente os teores de glúten, considerando o valor obtido ao final da maturação sem o processo de filtração. Por isso, embora tenha havido diferenças entre os valores da triplicata, o objetivo foi atingido: foi possível produzir uma cerveja sem glúten. Os resultados favoráveis obtidos em alguns ensaios permitem futuramente estudar tempos reduzidos de maturação e também a aplicação de somente meia dose de PEP quando há uma etapa final de filtração com terra diatomácea e perlita.

WATSON *et al.* (2019), em seu estudo sobre a fabricação de cerveja lager sem glúten, do mesmo modo que os estudos anteriores, também usou a AN-PEP, porém a aplicação foi testada em escala industrial (capacidade de 3000 hL), representando uma proposta de estudo mais concreta em relação a possibilidade de obter uma cerveja sem glúten comercialmente disponível. A etapa de mosturação teve o seguinte perfil de temperatura:

Tabela 8: Perfil de temperatura, Etapa de mosturação

Temperatura	Tempo
64 °C	30 min
72 °C	30 min
78 °C	10 min

Fonte: WATSON *et al.* (2019) (Adaptado)

Após, foi realizada uma etapa de filtração, adição de lúpulo, fervura e a retirada do precipitado formado durante a fervura. Por fim, foi realizada a fermentação (12 °C por 5 dias), adição de sílica gel (atuam em proteínas de alto peso molecular para melhorar a estabilidade e turbidez), maturação (0 °C por 11 dias) e filtração com terra diatomácea e PVPP (PoliVinilPoliPirrolidona, usada para precipitação de polifenóis e estabilização da cerveja). A diferença para a cerveja controle é que foi adicionado AN-PEP (2,2 mL/hL) na etapa de fermentação. Em relação ao teor de glúten, não foi observada diferença significativa na diminuição do teor de glúten em relação ao final da etapa de mosturação e ao final da etapa de fermentação, quando já havia sido adicionada a AN-PEP. Houve diminuição significativa, de aproximadamente 82 % quando a sílica gel foi adicionada, porém comparando a amostra controle e com AN-PEP não houve diferença significativa, indicando que provavelmente a diminuição do teor de glúten não ocorreu devido à ação da AN-PEP, mas sim da sílica gel. A maior diferença encontrada com o uso de AN-PEP foi a diminuição do teor de polipeptídeos do glúten, tendo atingido valores de 10 ppm. Sendo assim, foi obtido 5 ppm de glúten no produto final quando usados os processos de aplicação de AN-PEP e sílica gel combinados. Além disso, não foi possível perceber diferença entre a cerveja controle e a sem glúten, quando comparadas pelos consumidores.

BENUCCI *et al.* (2020), já tendo constatado a eficiência do uso da prolil endopeptidase de *A. niger* (AN-PEP) para produção de cerveja sem glúten com base em estudos anteriores, investigou a viabilidade da imobilização da AN-PEP em um suporte de quitosana para produção de cerveja sem glúten, representando uma alternativa favorável, visto que a estabilidade operacional de uso da enzima é favorecida, e, além disso, poderia permitir o uso em ciclos (reuso). Primeiramente foi realizada a imobilização enzimática, através da imersão sob agitação do suporte em uma solução contendo AN-PEP. Foi determinado a concentração ideal da solução com a enzima para imobilização considerando não somente a quantidade de AN-PEP aderidas ao suporte, mas também a sua atividade enzimática. Para isso, foram realizadas medidas de concentração de proteína usando a BSA (Albumina de Soro Bovino) como proteína padrão. Foi determinada a concentração da solução com AN-PEP de 0,3 mg_{BSAeq}/mL, visto que a sua atividade após a imobilização foi a maior, considerando o teste em diferentes concentrações (0,1 a 4,6 mg_{BSAeq}/mL). Significando que, uma concentração maior de enzima imobilizada não

necessariamente implica em maior atividade enzimática, pois podem ocorrer interações entre as proteínas, devido a sua carga excessiva no suporte, comprometendo a sua atividade. Após foi realizado um estudo comparativo entre o pH e a temperatura ideal para atividade da enzima livre e imobilizada, para isso foi usado a solução denominada cerveja sintética (tampão de acetato de sódio 0,1M, pH 4,5, 5% (v/v) de etanol). A temperatura ótima para a enzima livre foi de 60 °C, enquanto que para a enzima imobilizada, foi de 50 °C, porém obteve aproximadamente metade da atividade enzimática quando comparada a obtida para a enzima livre na sua temperatura ótima. Já o pH ótimo foi investigado a 20 °C (simulando uma temperatura de pós fermentação) e também nas temperaturas ideais. Para ambas as enzimas, independentemente da temperatura, foram obtidos maiores valores de atividade em pH de 4,2 – 4,5, faixa que representa justamente o pH médio da cerveja. Para a análise de teor de glúten, uma cerveja foi tratada em um reator de leito fluidizado com a AN-PEP imobilizada simulando uma etapa posterior a etapa de maturação. Foi determinado em estudos prévios os parâmetros para o reator a 20 °C, de modo que os biocatalisadores imobilizados ficassem em suspensão e também houvesse a recirculação da cerveja. A simulação de uma etapa posterior a maturação foi escolhida pelo autor considerando que nas etapas anteriores já ocorre uma diminuição no teor de glúten naturalmente, seja desde a ação de enzimas endógenas na etapa de mosturação até a precipitação de proteínas pela baixa temperatura, na etapa de maturação (fermentação secundária). Como resultado, o teor de glúten da cerveja diminuiu de 65 ppm até 19 ppm após 9h e até 15 ppm após 10h. Sendo assim, foi possível obter um produto final sem glúten a partir de uma peptidase imobilizada, visto que o tratamento contínuo da cerveja no reator de leito fluidizado gerou resultados positivos. No entanto, do ponto de vista operacional e de viabilidade, seriam necessários mais estudos a fim de verificar também o potencial efeito da imobilização enzimática nas etapas anteriores do processo simulado por BENUCCI *et al.* (2020) e também avaliar aspectos relacionados ao reuso.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objeto de estudo apresentar um panorama do processo de obtenção de uma cerveja sem glúten a partir da aplicação de enzimas exógenas. Foi possível observar que, embora a doença celíaca já esteja presente na realidade mundial, e já tenham vários alimentos especialmente desenvolvidos para essa parcela da população, somente na última década começaram-se os estudos relacionados a produção de uma cerveja sem glúten e, atualmente, elas já estão disponíveis no mercado.

Além disso, a maioria dos artigos disponíveis na literatura estudam a aplicação da peptidase obtida do mesmo microrganismo (*A. niger*) e já disponível comercialmente, somente com variações em relação aos parâmetros de processo, concentração usada, como é feita a aplicação da peptidase ou escala de processamento. Todos os artigos em que foi aplicada a enzima comercial, ela foi adicionada na etapa de fermentação, somente no estudo desenvolvido por KNORR; WIESER; KOEHLER (2016) houve aplicação de AN-PEP de maneira diferenciada dos outros estudos, em duas partes, no início e ao final da fermentação. Em relação a concentração de AN-PEP usada, somente o estudo de FIEDLER *et al.* (2019) testou diferentes concentrações. Considerando que o preparado enzimático usado nesses estudos já é bem conhecido e usado, seria interessante testar o uso de diferentes concentrações, a fim de obter a ideal, uma vez que todos os autores que desenvolveram seus trabalhos com a aplicação dessa peptidase, testaram em diferentes tipos de cerveja, e, por isso, as concentrações enzimáticas usadas em cada artigo não são passíveis de comparação.

A aplicação de peptidases obtidas de outros microrganismos para a produção de cerveja sem glúten, ainda que apresentem uma outra alternativa, ainda são pouco estudadas. No trabalho desenvolvido por SHETTY *et al.* (2017) foi estudada uma prolil endopeptidase obtida de outro microrganismo, mas não foi obtido o resultado final desejado. No entanto, ainda que tenham sido estudadas duas concentrações diferentes da peptidase, ela foi aplicada na etapa de mosturação. Como já foi citado anteriormente, a maioria dos estudos relacionados a aplicação de enzimas exógenas para a produção de cerveja sem glúten adiciona o preparado enzimático na etapa de fermentação. Por isso, ainda que seja interessante a tentativa de aplicação enzimática

em outras etapas do processo, para um preparado enzimático que está recém sendo isolado, purificado e aplicado, é interessante o estudo nas etapas do processo em que já se tem bastantes dados em relação a resultados favoráveis.

A imobilização enzimática é uma técnica que vem sendo muito estudada, uma vez que a enzima fica imobilizada em um suporte sólido. BENUCCI *et al.* (2020) em seu estudo, testou a aplicação de enzimas imobilizadas para a obtenção da cerveja sem glúten e obteve resultados positivos. As principais vantagens nessa aplicação é a possibilidade de separar a enzima do produto final com certa facilidade, trabalhar em um sistema contínuo e, conseqüentemente, fazer o reuso, porém no estudo, o autor não explorou essa grande vantagem da imobilização enzimática.

Sendo assim, muitos estudos em relação a aplicação de enzimas exógenas para a obtenção de cerveja sem glúten ainda são necessários, ainda que já se tenha esse produto comercialmente disponível no mercado, a variedade de estilos ainda é limitado para esse tipo de produto, embora já existam estudos com diferentes estilos de cerveja. Por isso, esse é um tema que deve ser explorado pois ainda há muito a ser descoberto, para que cada vez mais as condições de processo sejam otimizadas a fim que a oferta de produtos aumente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, Halina Mayer Chaves *et al.* Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. **Revista de Nutricao**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 467–474, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000300014>

BELTI, Marcos Antônio; DUARTE, Felipe; GEORG-KRAEMER, Janaína Endres. A temperatura no desenvolvimento da atividade das enzimas (1-3, 1-4)- β -glucanases e degradação de β -glucanos durante a malteação. **Ciencia Rural**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 467–473, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000300013>

BENUCCI, Ilaria *et al.* Prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* immobilized on a food-grade carrier for the production of gluten-reduced beer. **Food Control**, [s. l.], v. 110, n. July 2019, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106987>

CATASSI, Carlo *et al.* A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 160–166, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.1.160>

COLGRAVE, Michelle L. *et al.* Proteomics as a tool to understand the complexity of beer. **Food Research International**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 1001–1012, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.043>

DE OLIVEIRA, George Augusto V.; DA SILVA, José Maurício Schneedorf Ferreira. Equilíbrio Químico E Cinética Enzimática Da Interação De α -Amilase Com Compostos Fenólicos Encontrados Em Cerveja. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 726–732, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170058>

DI GHIONNO, Lidia *et al.* Brewing with prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* : the impact of enzymatic treatment on gluten levels, quality attributes and sensory profile. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1367–1374, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13375>

DOS SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves; SATO, Hélia Harumi. Microbial

proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, [s. l.], v. 103, n. September 2017, p. 253–262, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>

EHREN, Jeniffer *et al.* A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 1–10, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006313>

FANARI, Mauro *et al.* Comparison of enzymatic and precipitation treatments for gluten-free craft beers production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 49, n. March, p. 76–81, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.017>

FIEDLER, Katherine L. *et al.* Detection of gluten in a pilot-scale barley-based beer produced with and without a prolyl endopeptidase enzyme. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 1151–1162, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1616830>

GAMA E SILVA, Tatiana Sudbrach da; FURLANETTO, Tania Weber. Artigo de Revisão: Diagnóstico de doença celíaca em adultos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 122–126, 2010.

GUERDRUM, Lindsay J.; BAMFORTH, Charles W. Levels of gliadin in commercial beers. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 129, n. 4, p. 1783–1784, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.021>

GURUMALLESH, Poorani *et al.* A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 128, p. 254–267, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>

GUTOWSKI, Emily D. *et al.* Can individuals with celiac disease identify gluten-free foods correctly? **Clinical Nutrition ESPEN**, [s. l.], v. 36, p. 82–90, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2020.01.012>

HAGER, Anna Sophie *et al.* Gluten free beer - A review. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 44–54, 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.001>

HOWARD, K. A. *et al.* The relationship between D hordein and malting quality in barley. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 47–53, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jcrs.1996.0036>

KIRK, Ole; BORCHERT, Torben Vedel; FUGLSANG, Claus Crone. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2)

KNORR, Verena; WIESER, Herbert; KOEHLER, Peter. Production of gluten-free beer by peptidase treatment. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 242, n. 7, p. 1129–1140, 2016a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2617-5>

KNORR, Verena; WIESER, Herbert; KOEHLER, Peter. Production of gluten-free beer by peptidase treatment. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 242, n. 7, p. 1129–1140, 2016b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2617-5>

KUMARI, Arpana *et al.* Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 2, p. 108–114, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.05.009>

LAUREANO, Álvaro Macedo. **Análise da presença de glúten em alimentos rotulados como livres de glúten através de ensaio imunoenzimático e de fitas imunocromatográficas**. 2010. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/87304/000910454.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12/03/2021.

MACHADO, Jéssica Pereira. **Aplicação de método baseado em PCR em tempo real para detecção de glúten em alimentos destinados a portadores de doença celíaca**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/handle/11422/6056>. Acesso em: 12/05/2021

MARCUSSO, Eduardo Fernandes; MÜLLER, Carlos Vitor. A CERVEJA NO BRASIL:

O ministério da agricultura informando e esclarecendo. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, [s. l.], p. 1–5, 2017. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf/@@download/file/A CERVEJA NO BRASIL-28.08.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf/@@download/file/A%20CERVEJA%20NO%20BRASIL-28.08.pdf)>. Acesso em: 12/05/2021

MITEA, C. *et al.* Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: Implications for coeliac disease. **Gut**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 25–32, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gut.2006.111609>

RUBIO-FLORES, Monica; SERNA-SALDIVAR, Sergio O. Technological and Engineering Trends for Production of Gluten-Free Beers. **Food Engineering Reviews**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 468–482, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12393-016-9142-6>

SAPONE, Anna *et al.* Spectrum of gluten-related disorders: Consensus on new nomenclature and classification. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 13, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-13>

SCHERF, Katharina Anne; WIESER, Herbert; KOEHLER, Peter. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. **Food Research International**, [s. l.], v. 110, p. 62–72, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.021>

SDEPANIAN, Vera Lúcia; DE MORAIS, Mauro Batista; FAGUNDES-NETO, Ulysses. DOENÇA CELÍACA: A evolução dos conhecimentos desde sua centerária descrição original até os dias atuais. **Arq. Gastroenterol.**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 244–257, 1999.

SHETTY, Radhakrishna *et al.* Discovery, cloning and characterisation of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerobacter thermophiles*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 107, n. August, p. 57–63, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.08.002>

SILVA, Rafael Plaza da. **Detecção e quantificação de glúten em alimentos industrializados por técnica de ELISA**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de

São Paulo. Disponível em:< http://www.riosemgluten.com/contamin_por_gluten.pdf>. Acesso em> 12/05/2021.

SINGH, Prashant *et al.* Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 823-836.e2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>

WATSON, H. G. *et al.* Applicability of different brewhouse technologies and gluten-minimization treatments for the production of gluten-free (barley) malt beers: Pilot- to industrial-scale. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 245, n. September 2018, p. 33–42, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.015>

YONAMINE, Glauce; PINOTTI, Renata. **Alergia Alimentar: Alimentação, Nutrição e Terapia Alimentar**. 1 ed. Barueri (SR): Manole, 2021. P. 69 – 84