



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Lucas Lourenço dos Santos

**UM COADJUVANTE DE TECNOLOGIA NA INOVAÇÃO DE PRODUTOS
PANIFICADOS: A INFLUÊNCIA DA TRANSGLUTAMINASE MICROBIANA
NAS PROPRIEDADES FÍSICAS DE BISCOITOS SEM GLÚTEN
CONTENDO FARINHA DE CASTANHA-DO-BRASIL**

Florianópolis

2024

Lucas Lourenço dos Santos

**UM COADJUVANTE DE TECNOLOGIA NA INOVAÇÃO DE PRODUTOS
PANIFICADOS: A INFLUÊNCIA DA TRANSGLUTAMINASE MICROBIANA
NAS PROPRIEDADES FÍSICAS DE BISCOITOS SEM GLÚTEN
CONTENDO FARINHA DE CASTANHA-DO-BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Maria Manuela Camino Feltes, Dr.^a
Coorientador: Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.

Florianópolis

2024

Santos, Lucas Lourenço dos

Um coadjuvante de tecnologia na inovação de produtos panificados : A influência da transglutaminase microbiana nas propriedades físicas de biscoitos sem glúten contendo farinha de castanha-do-brasil / Lucas Lourenço dos Santos ; orientadora, Maria Manuela Camino Feltes, coorientador, Pedro Luiz Manique Barreto, 2025.

49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Transglutaminase microbiana. 3. Biscoitos sem glúten. 4. Propriedades físicas. 5. Biotecnologia. I. Feltes, Maria Manuela Camino. II. Barreto, Pedro Luiz Manique. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Lucas Lourenço dos Santos

**UM COADJUVANTE DE TECNOLOGIA NA INOVAÇÃO DE PRODUTOS
PANIFICADOS: A INFLUÊNCIA DA TRANSGLUTAMINASE MICROBIANA
NAS PROPRIEDADES FÍSICAS DE BISCOITOS SEM GLÚTEN
CONTENDO FARINHA DE CASTANHA-DO-BRASIL**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia de Alimentos

Florianópolis, 17 de Dezembro de 2024.

**Insira neste espaço
a assinatura**

Prof.^a Patrícia Poletto, Dr.^a
Coordenação do Curso

Banca examinadora

**Insira neste espaço
a assinatura**

Prof.^a Maria Manuela Camino Feltes, Dr.^a
Orientador

**Insira neste espaço
a assinatura**

Prof.^a Débora de Oliveira, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

**Insira neste espaço
a assinatura**

Prof. Germán Ayala Valencia, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024

À minha mãe... uma conquista não só minha, mas nossa!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus!

À minha mãe por me ajudar a enfrentar todas as lutas, pelo apoio e incentivo! Por tudo que já tem feito por mim, que por palavras não conseguiria descrever tamanha gratidão e admiração que tenho!

À minha namorada Giovana Nascimento de Oliveira e sua família, por toda paciência, apoio, incentivo que tem me dado e por todas as conversas. Isso com certeza foi importante para mim!

Ao meu avô Noel Rosa e meu tio Leandro Aparecido Rosa por tudo que já me ajudaram ao longo da graduação, pelo apoio e incentivo que me deram!

Ao meu pai, agradeço por tudo que tem feito por mim!

À Prof.^a Dr.^a Maria Manuela Camino Feltes pela orientação e confiança, não só neste trabalho, mas também em vários outros momentos da graduação que, sem dúvidas, foram muito importantes para minha formação acadêmica. E foi da disciplina ministrada por ti (Bioquímica de Alimentos II), que surgiu esse grande interesse pelo tema.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto, pela coorientação deste trabalho.

À Ana Luísa Schiessl Fabri (do grupo de estudos), por todo o auxílio e ajuda que tem me dado ao longo do desenvolvimento deste trabalho, desde a elaboração dos biscoitos ao trabalho escrito.

Aos meus amigos Jeferson Correa Júnior e Matheus Dias, amigos da época de escola, que sempre me apoiaram, ajudaram e me incentivaram nessa caminhada!

Às amigadas feitas ao longo da graduação. E aos professores que contribuíram com a minha formação!

Aos técnicos, estudantes e professores do Laboratório de Panificação da Usina Piloto de Alimentos, do Laboratório de Óleos e Gorduras (LOG), do Laboratório de Frutas e Hortaliças (LFH), do Laboratório de Análises de Alimentos (LABCAL) e do Laboratório 2 da Central de Análises do EQA, que tornaram possível a elaboração dos biscoitos e/ou a realização das análises necessárias deste estudo.

Por fim, um agradecimento ao CNPq/SESCOOP (Projeto CNPq n. 404334/2022-9).

Um forte abraço a todos!

Obrigado!

"A vida não para"
(Lenine)

RESUMO

A transglutaminase de origem microbiana (mTGase) é uma enzima capaz de catalisar reações de incorporação de amina, desamidação e reticulação. Na reação de reticulação (ou polimerização) são formadas ligações cruzadas covalentes de ϵ -(γ -glutamil)-lisina entre cadeias polipeptídicas, intra ou intermoleculares. Na área de alimentos, essa reação desempenha um papel importante na modificação das propriedades funcionais e tecnológicas de proteínas. Este estudo teve como objetivo investigar o impacto da mTGase comercial sobre as propriedades físicas da massa crua e de biscoitos sem glúten com farinha de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*). As concentrações testadas de enzima foram 0% (Controle), 0,0085% (C85) e 0,0140% (C140), em relação ao *mix* de farinha. Os resultados mostraram que, na análise de perfil de textura da massa crua, a adição da mTGase aumentou a dureza ($p \leq 0,05$); diminuiu a coesividade entre as amostras Controle e C140 ($p \leq 0,05$), e não alterou significativamente a adesividade, nem a elasticidade ($p > 0,05$). Em relação à atividade de água ($A_w < 0,2$ para todas as amostras), houve o aumento dos valores conforme o aumento da concentração de mTGase ($p \leq 0,05$). Quanto à cor, o índice de escurecimento (calculado a partir dos parâmetros L^* , a^* e b^*) diminuiu com a adição da enzima ($p \leq 0,05$). Na análise de corte, a dureza dos biscoitos diminuiu com a adição de mTGase, tendo diferença estatisticamente significativa entre as amostras Controle e C140. A resistência ao corte, entretanto, não foi influenciada pela enzima. De forma semelhante, o teste de perfuração, o fator de expansão e a perda de massa dos biscoitos não foram significativamente influenciados pela adição da enzima ($p > 0,05$). As modificações observadas em algumas propriedades avaliadas provavelmente são resultado da formação de ligações cruzadas entre as proteínas da massa dos biscoitos sem glúten. Estes resultados sugerem que a aplicação da transglutaminase microbiana pode representar uma abordagem promissora nas modificações de características específicas de biscoitos sem glúten.

Palavras-chave: transglutaminase microbiana; biscoitos sem glúten; propriedades físicas; biotecnologia.

ABSTRACT

The microbial transglutaminase (mTGase) is an enzyme capable of catalyzing amine incorporation, deamidation, and cross-linking reactions. In the cross-linking (or polymerization) reaction, covalent ϵ -(γ -glutamyl)-lysine bonds are formed between intra- or intermolecular polypeptide chains. In the food industry, this reaction plays an important role in modifying the functional and technological properties of proteins. This study aimed to investigate the impact of commercial mTGase on the physical properties of raw dough and gluten-free cookies made with Brazil nut flour (*Bertholletia excelsa*). The tested enzyme concentrations were 0% (Control), 0.0085% (C85), and 0.0140% (C140) of mTGase relative to the flour mixture. The results showed that in the texture profile analysis of raw dough, the addition of mTGase increased hardness ($p \leq 0.05$), decreased cohesiveness between the Control and C140 samples ($p \leq 0.05$), and did not significantly affect adhesiveness or elasticity ($p > 0.05$). Regarding water activity ($A_w < 0.2$ for all samples), values increased with higher mTGase concentrations ($p \leq 0.05$). For color, the browning index (calculated from L^* , a^* , and b^* parameters) decreased with enzyme addition ($p \leq 0.05$). In the cutting analysis, cookie hardness decreased with mTGase addition, with statistically significant differences observed between the Control and C140 samples. Cutting resistance, however, was not influenced by the enzyme. Similarly, the perforation test, expansion factor, and weight loss of the cookies were not significantly affected by enzyme addition ($p > 0.05$). The observed modifications in some of the evaluated properties are likely due to the formation of cross-links between proteins in the gluten-free dough. These findings suggest that the application of microbial transglutaminase may represent a promising approach for altering specific characteristics of gluten-free cookies.

Keywords: microbial transglutaminase; gluten-free cookies; physical properties; biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de classificação EC da enzima TGase.....	21
Figura 2 – Tríades catalíticas em TGase microbiana e suas respectivas posições. A linha tracejada (à esquerda) corresponde a região do sítio ativo da enzima. À direita, destaca-se a ampliação da região tracejada.....	22
Figura 3 – Primeira etapa: mecanismo de ação da mTGase.....	23
Figura 4 – Segunda etapa: reação de incorporação de amina catalisadas pela mTGase.....	23
Figura 5 – Segunda etapa: reação de reticulação catalisadas pela mTGase.....	24
Figura 6 – Segunda etapa: reação catalisada pela mTGase na presença de água.....	24
Figura 7 – Reatividade da TGase derivada de <i>S. mobaraense</i> com proteínas alimentares.....	26
Figura 8 – Possibilidades de aplicações de mTGase na indústria alimentícia.....	28
Figura 9 – Etapas de elaboração dos biscoitos.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades ótimas e características de transglutaminase de diferentes origens..	25
Tabela 2 – Formulações de biscoitos sem glúten sem enzima (Controle) e com adição de 85 ppm e 140 ppm (C85 e C140, respectivamente) de mTGase.....	34
Tabela 3 – Atividade de água das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.....	39
Tabela 4 – Parâmetros colorimétricos das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.....	40
Tabela 5 – Teste de resistência ao corte das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.....	41
Tabela 6 – Teste de perfuração das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.....	42
Tabela 7 – Medidas (vertical e horizontal) e fator de expansão das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.....	43
Tabela 8 – Perda de massa (em gramas) das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.....	43
Tabela 9 – Análise do perfil de textura das amostras de massa crua de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aw	Atividade de água
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CTC	Centro Tecnológico
DC	Doença Celíaca
EC	<i>Enzyme Commission</i>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
IE	Índice de escurecimento
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LABCAL	Laboratório de Análises de Alimentos
LFH	Laboratório de Óleos e Gorduras
LOG	Laboratório de Óleos e Gorduras
mTGase	Transglutaminase microbiana
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RTIQ	Requisitos Técnicos de Identidade e Qualidade
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
TGase	Transglutaminase
TPA	<i>Texture Profile Analysis</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	17
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1	PRODUTOS ALIMENTÍCIOS INOVADORES.....	19
3.2	ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES.....	20
3.2.1	Transglutaminases.....	20
3.2.1.1	<i>Reações catalisadas pela mTGase.....</i>	<i>22</i>
3.2.1.2	<i>Características da mTGase e fatores que influenciam a atividade catalítica.....</i>	<i>25</i>
3.2.1.3	<i>Aplicações na área de alimentos e legislação brasileira.....</i>	<i>26</i>
3.2.1.3.1	Produtos à base de carne.....	28
3.2.1.3.2	Produtos à base de leite.....	29
3.2.1.3.3	Produtos à base de cereais e leguminosas.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	ELABORAÇÃO DOS BISCOITOS.....	33
4.1.1	Material.....	33
4.1.2	Pesagem do preparado enzimático.....	33
4.1.3	Obtenção da farinha de castanha-do-brasil.....	34
4.1.4	Preparo dos biscoitos.....	34
4.2	DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DOS BISCOITOS.....	35
4.2.1	Atividade de água.....	35
4.2.2	Cor instrumental.....	36
4.2.3	Teste de resistência ao corte.....	36
4.2.4	Teste de perfuração.....	36
4.2.5	Dimensões e fator de expansão dos biscoitos.....	37
4.2.6	Perda de massa.....	37
4.2.7	Análise do perfil de textura da massa crua.....	38
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	ATIVIDADE DE ÁGUA.....	39
5.2	COR INSTRUMENTAL.....	39

5.3	TESTE DE RESISTÊNCIA AO CORTE.....	41
5.4	TESTE DE PERFURAÇÃO.....	42
5.5	FATOR DE EXPANSÃO.....	42
5.6	PERDA DE MASSA.....	43
5.7	ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA DA MASSA.....	44
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

A transglutaminase (TGase, EC 2.3.2.13) é uma enzima que está amplamente presente nos seres vivos, tais como: animais, vegetais e microrganismos; e desempenha um papel fundamental em diversas funções fisiológicas desses organismos (Miwa, 2020). Entre as preparações disponibilizadas comercialmente, a transglutaminase de origem microbiana (mTGase), com destaque para o microrganismo *Streptomyces mobaraense* (classificado anteriormente como *Streptoverticillium mobaraense*), é atualmente a principal fonte destinada às aplicações em alimentos, definida pela *Food and Drugs Administration* (FDA) como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (Fátima; Khare, 2018).

A mTGase possui vantagens em comparação às demais fontes, o que a torna atrativa. Um dos pontos positivos é que essa enzima não necessita do íon cálcio para sua ativação, enquanto as derivadas de animais e vegetais são dependentes desse cofator. A TGase de mamíferos (utilizada antes da descoberta da mTGase) era isolada de fígado de porquinhos-da-índia e desfavorável nas aplicações em alimentos, pois apresentava coloração avermelhada, comprometendo o aspecto visual do produto final (Duarte *et al.*, 2020).

Pertencente à classe das transferases, a mTGase catalisa reação entre um grupo γ -carboxamida de um resíduo de glutamina acessível do substrato proteico que atua como acil doador, e o grupo ϵ -amino (acil receptor) de uma amina primária (incorporação de amina) ou um resíduo de lisina de uma proteína ou peptídeo (reticulação ou polimerização). Na ausência do grupo ϵ -amino, a água pode atuar como acceptor de acil (desamidação), formando resíduos de ácido glutâmico. Em todas as reações, há a liberação de amônia (Miwa, 2020).

Na reticulação (ou reação de transamidação), são formadas ligações cruzadas covalentes intra ou intermoleculares de ϵ -(γ -glutamil)-lisina, resultando em alterações significativas nas propriedades físico-químicas das proteínas, modificando-as quanto à solubilidade, à capacidade de retenção de água, à capacidade emulsificante, à formação de espuma, à viscosidade, à elasticidade e/ou à gelificação (Akbari; Razavi; Kieliszek, 2021). A utilização dessa enzima não interfere no pH, cor ou sabor dos alimentos. Além disso, pode torná-los mais nutritivos pela incorporação de aminoácidos essenciais (Fátima; Khare, 2018).

Muitas das proteínas presentes nos alimentos podem ser reticuladas pela mTGase, tais como: caseína de leite, proteínas de soro de leite, globulinas de soja, glúten de trigo, miosinas de carne e proteínas de ovo (Kolotylo; Piwowarek; Kieliszek, 2023). A transglutaminase microbiana tem sido amplamente empregada na indústria alimentícia, pois a formação de ligações covalentes entre proteínas pode auxiliar na obtenção de produtos com

características aprimoradas e/ou inovadoras (Zhao, 2023), o que a torna atraente para esse setor.

Segundo Kieliszek e Misiewicz (2014), é amplamente empregada na fabricação de carne reestruturada, pois tem efeito positivo na textura do produto final, facilitando a forte coesão entre os blocos de carne sem a necessidade de tratamento térmico ou adição de sal ou fosfatos. Em leites fermentados com teor reduzido de gordura, as propriedades reológicas foram melhoradas, diminuindo significativamente a sinérese (Romeih; Walker, 2017). Além disso, para melhorar a qualidade de pães sem glúten (elaborados com farinhas de arroz, batata, milho), foi capaz de influenciar positivamente o volume específico e firmeza do produto (Amante; Fante; Pires, 2020).

1.1 JUSTIFICATIVA

A transglutaminase de origem microbiana apresenta-se como uma alternativa promissora para proporcionar melhorias nas características físico-químicas de alimentos panificados, dos tradicionais aos inovadores. Por isso, esse campo de pesquisa se revela interessante no ramo alimentício, especialmente quando considerados os desafios que surgem nas indústrias desse setor, principalmente diante da sofisticação das exigências dos consumidores, para que se possa estar alinhado a essas tendências.

Assim, tendo em vista os possíveis benefícios tecnológicos que podem ser proporcionados pela mTGase, o estudo e a compreensão aprofundada desses aspectos são necessários para o desenvolvimento de produtos aprimorados e/ou inovadores. Este estudo visa avaliar especificamente o impacto dessa enzima em propriedades físicas de biscoitos, características de grande importância, já que a textura é um atributo essencial e desejável para biscoitos, propriedade que afeta profundamente sua aceitabilidade pelo consumidor (Wesley, André e Clerici, 2021).

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo investigar o impacto da aplicação de uma transglutaminase comercial de origem microbiana (mTGase) sobre propriedades físicas da massa crua e de biscoitos sem glúten com farinha de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão dos estudos científicos sobre a aplicação da mTGase em produtos alimentícios, destacando as condições de processo, as vantagens do uso desta enzima, as características dos produtos obtidos, os efeitos e os desafios do processamento;
- Avaliar a influência da mTGase sobre a perda de massa por cozimento, as dimensões, o fator de expansão, a atividade de água e a cor instrumental dos biscoitos;
- Verificar o efeito da enzima sobre o perfil de textura da massa crua dos biscoitos através de análise instrumental;
- Avaliar a influência da enzima sobre a textura dos biscoitos assados, por meio dos testes de resistência ao corte e de perfuração.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUTOS ALIMENTÍCIOS INOVADORES

Na perspectiva do consumidor, alimentos tradicionais são comumente associados à qualidade e à tradição (Guiné *et al.*, 2021). Um alimento denominado “tradicional”, consiste em um produto singular que persiste no tempo, sempre produzido em determinada região e utilizando matérias-primas típicas e de qualidade única. Dessa forma, são preservadas as características que os definem quanto ao aspecto, à textura e ao sabor, que estão relacionados a uma cultura gastronômica regional (Zuin; Zuin, 2008).

Apesar de muitos consumidores estarem constantemente à procura de produtos mais saudáveis, nutritivos e que sejam mais convenientes, a inovação torna-se essencial para atender a essas exigências. Nesse contexto, para acompanhar a constante evolução, os alimentos tradicionais também necessitam de inovações, assim como qualquer outro produto alimentício (Guiné *et al.*, 2021).

Segundo Fagerberg (2006), um processo de desenvolvimento e introdução de novas ideias, métodos ou produtos que resultam em melhorias e avanços significativos, pode ser definido como inovação. A partir dessa concepção, é possível dizer que, para caracterizar um produto alimentício como inovador, é válida a combinação de diferentes ingredientes na elaboração ou técnicas de preparo, por meio das quais seja possível buscar maior qualidade nutricional e sensorial, vida de prateleira, segurança, sustentabilidade e adesão às novas tendências.

Na edição “Indústria de Alimentos 2030” publicada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, 2020), destaca-se que, em virtude dos malefícios à saúde associados à má alimentação, muitos consumidores têm buscado evitar o consumo de alimentos com altas quantidades de gorduras, calorias, açúcares e sódio, havendo uma crescente preocupação em manter uma dieta mais saudável e rica em nutrientes. O aumento do valor nutricional de produtos alimentícios industrializados tem sido alcançado por meio da inovação tecnológica, adequando-os às novas tendências de consumo.

Ainda de acordo com o ITAL (2020), com o objetivo de atender às demandas mencionadas acima, empresas têm estabelecido parâmetros mínimos para o teor de nutrientes considerados “positivos” (como fibras, proteínas, entre outros), impulsionando o lançamento de novos alimentos e bebidas não-alcoólicas. Essas empresas estão empenhadas em reformular diversos produtos para promover a saudabilidade, e têm definido metas para a redução de

açúcares, sódio e gorduras em vários produtos. Nesse contexto, é notável que enzimas podem desempenhar um papel fundamental e ser uma alternativa promissora para enfrentar tais desafios, sendo indispensável explorá-las e aplicá-las em processos industriais.

3.2 ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES

As enzimas são biocatalisadores capazes de aumentar a velocidade de reações bioquímicas, e apresentam alta especificidade pelo substrato e atuam sob condições brandas de temperatura e pH, além de não gerarem resíduos e compostos tóxicos, principalmente quando comparadas a catalisadores químicos. Devido a sua aplicabilidade, as enzimas são uma alternativa que desperta um grande interesse das indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos (Denti *et al.*, 2022).

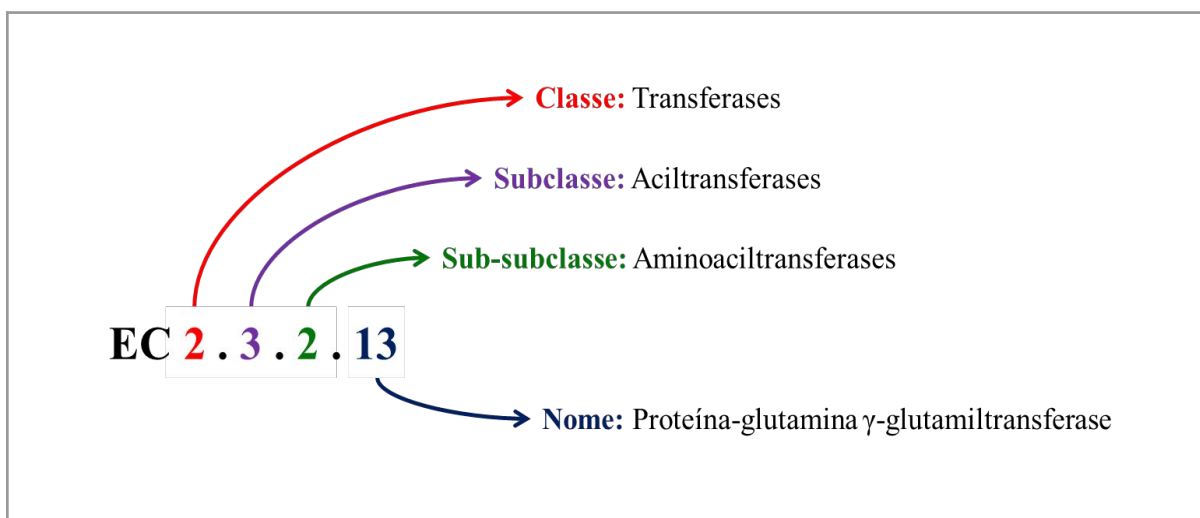
Na indústria alimentícia, por exemplo, as enzimas podem ser utilizadas em vários segmentos, incluindo: laticínios, panificação, bebidas alcoólicas e não-alcoólicas, óleos e gorduras, carnes e pescados, além de alimentos com propriedades funcionais. A aplicação desses catalisadores biológicos se dá pela sua capacidade de modificar e melhorar as propriedades técnico-funcionais, nutricionais e sensoriais de ingredientes e formulações de alimentos (Pacheco *et al.*, 2022).

Quanto à modificação de proteína, destacam-se as transglutaminases (TGases) em aplicações industriais, pois são frequentemente utilizadas devido à sua capacidade de catalisar reações de reticulação (polimerização) de proteínas e peptídios (Romeih; Walker, 2017). Desde 1998, quando a TGase foi aprovada pela *Food and Drugs Administration* (FDA) e considerada como *Generally Recognized as Safe* (GRAS), tem sido amplamente empregada na indústria alimentícia para fornecer produtos com propriedades melhoradas e/ou inovadoras que atendam às necessidades dos consumidores (Zhao, 2023).

3.2.1 Transglutaminases

A enzima transglutaminase (TGase), como proposto pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB, 2023), pertence à classe das transferases e possui o nome sistemático de proteína-glutamina:amina γ -glutamyltransferase (também chamada de fator XIIIa, fibrinogase, fator estabilizador de fibrina, glutaminilpeptídeo γ -glutamyltransferase, transglutaminase tecidual, entre outros) e recebe o número de classificação EC 2.3.2.13 (EC, *Enzyme Commission*), como demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Número de classificação EC da enzima TGase.

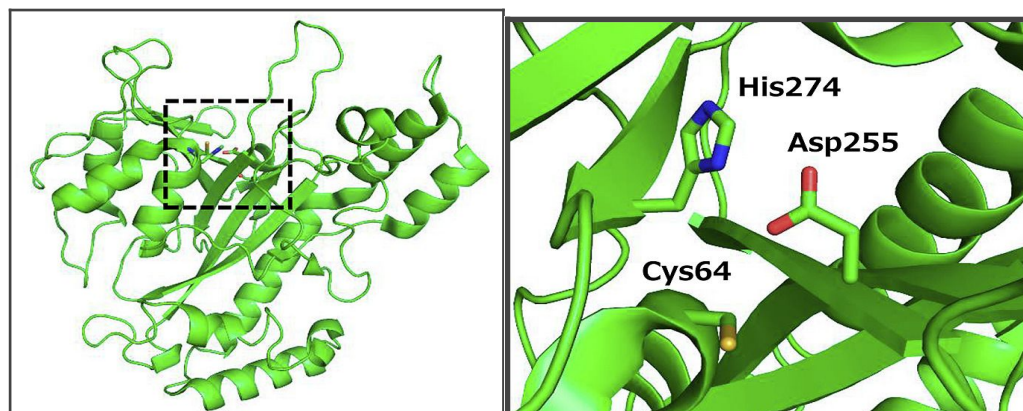


Fonte: Elaborado pelo autor.

Essa proteína está amplamente distribuída na natureza e ocorre em diversos tecidos animais, vegetais e microbianos. Em animais, a TGase tem um papel crítico nas ligações cruzadas da fibrina, que estão envolvidas na coagulação sanguínea; e da queratinização, associado ao desenvolvimento do tecido epidérmico, entre outras funções. Nas plantas, parece estar relacionada com a formação do citoesqueleto e da parede celular, enquanto em bactérias a enzima TGase pode estar envolvida na montagem do revestimento em células esporuladas (Damodaran; Parkin; Fennema, 2010).

A ativação das TGases, seja de origem animal ou vegetal, dependem da presença do íon Ca^{2+} . Essa ativação ocorre devido à mudança conformacional da enzima, após a ligação do íon cálcio, o que leva à exposição dos resíduos de aminoácidos no centro catalítico (Kolotylo; Piwowarek; Kieliszek, 2023). No caso da TGase de mamíferos, o mecanismo catalítico é baseado em uma tríade dos aminoácidos Cisteína-Histidina-Aspartato (Cys-His-Asp) não adjacentes, enquanto as de origem microbianas são sequencialmente diferentes, ou seja, Cys-Asp-His (Duarte *et al.*, 2020) e apresentando apenas um único resíduo de cisteína (Motoki; Seguro, 1998), conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Tríades catalíticas em TGase microbiana e suas respectivas posições. A linha tracejada (à esquerda) corresponde a região do sítio ativo da enzima. À direita, destaca-se a ampliação da região tracejada.



Fonte: Miwa (2020), adaptado pelo autor.

A TGase tissular (ou TGase 2) era isolada de porquinhos-da-índia e apresentava coloração avermelhada, inviabilizando a sua aplicação em produtos alimentícios (Duarte *et al.*, 2020). A TGase vegetal, por sua vez, é sensível à luz (Akbari; Razavi; Kieliszek, 2021). A partir de 1989, a transglutaminase microbiana (mTGase) foi produzida para aplicações industriais através do processo de fermentação tradicional utilizando o microrganismo *Streptoverticillium mobaraense*, posteriormente classificado como *Streptomyces mobaraense*. Ao contrário da TGase animal, a mTGase é independente de íon Ca^{2+} e sua ativação não requer cofatores especiais, e é produzida como uma enzima extracelular (Duarte *et al.*, 2019).

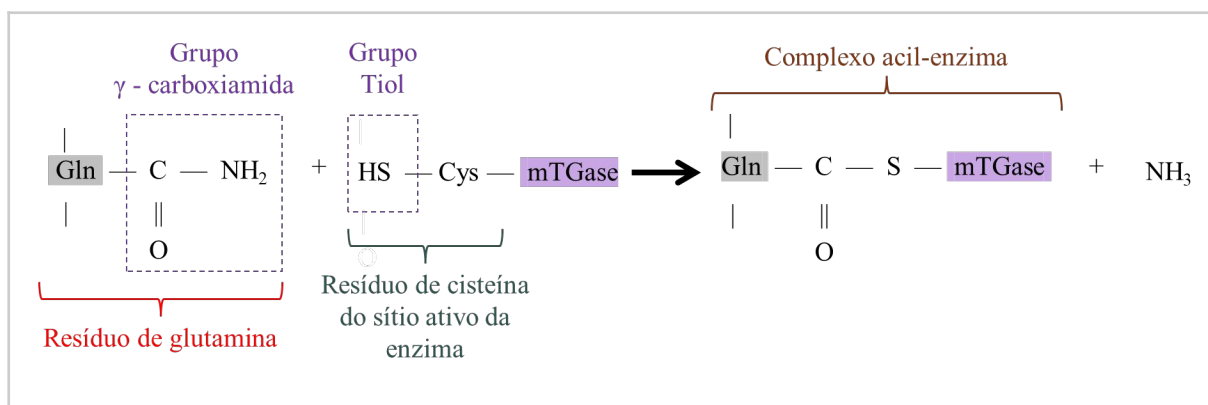
Embora o meio de cultura represente cerca de 30% dos custos totais de produção, os custos associados à síntese microbiana são consideravelmente mais baixos em comparação com os custos de produção de TGase a partir de fontes animais (Kolotylo; Piwowarek; Kieliszek, 2023). Ao ser isolada de fontes microbianas, facilitou os processos e resultou em maior economia de energia (Amirdivani *et al.*, 2018). Outra vantagem em relação às demais fontes, se deve também aos maiores rendimentos envolvidos em sua extração e purificação (Fátima; Khare, 2018), o que a torna mais atraente na produção industrial de enzimas.

3.2.1.1 Reações catalisadas pela mTGase

Na primeira etapa, o mecanismo de ação da transglutaminase microbiana, consiste no ataque do grupo tiol (SH) da cisteína presente no sítio ativo da enzima à cadeia lateral de um resíduo de glutamina (Gln) acessível no substrato proteico, formando um complexo acil-

enzima e liberando amônia (NH_3) (Figura 3). Em seguida, na segunda etapa, que depende do grupo amino aceptor de acil, as TGases podem modificar proteínas incorporando aminas, formando ligações cruzadas intra e intermoleculares ou desamidação, causando mudanças profundas na estrutura molecular das proteínas (Duarte *et al.*, 2020).

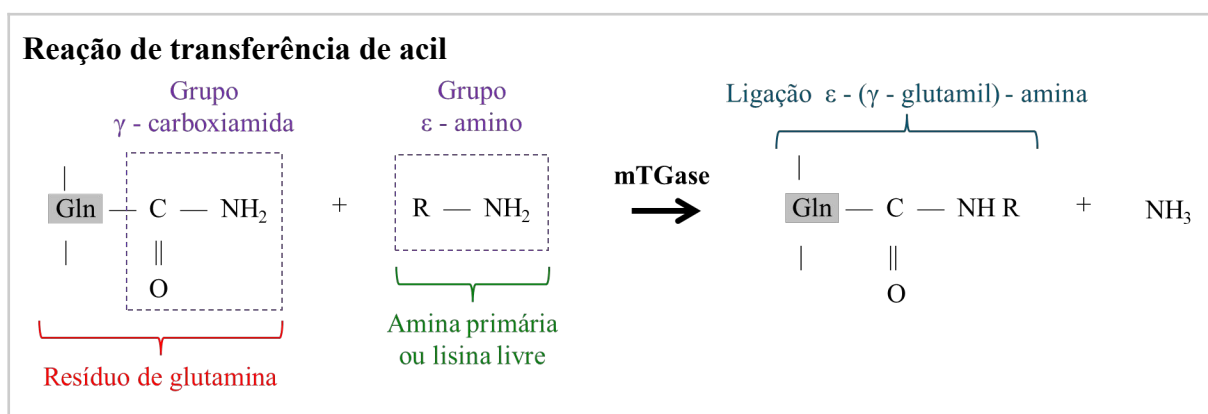
Figura 3 – Primeira etapa: mecanismo de ação da mTGase.



Fonte: Duarte *et al.* (2020) adaptado pelo autor.

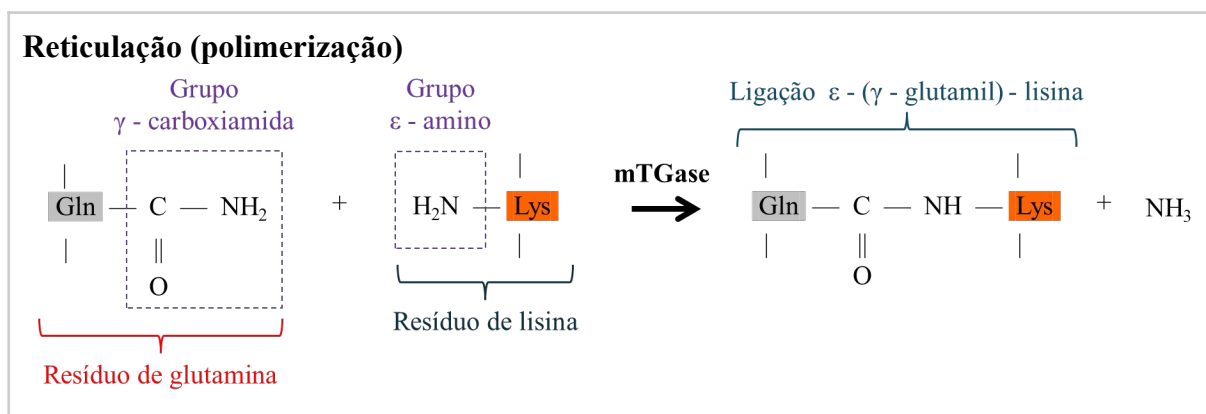
A reação de incorporação de amina ocorre através da transferência de grupos γ -carboxamida de proteínas ou peptídeos ligados a resíduos de Gln (doador de acil) para uma variedade de aminas primárias que atuam como aceptores de acil, incluindo o grupo ϵ -amino de uma lisina livre (Figura 4). Na reação de reticulação, na presença de um grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina (Lys) de uma proteína ou peptídeo (Figura 5), reage como um acil-receptor formando ligações ϵ -(γ -glutamil)-lisina entre cadeias polipeptídicas dentro da mesma molécula (intramolecular) ou entre duas moléculas diferentes (intermolecular) (Miwa, 2020).

Figura 4 – Segunda etapa: reação de incorporação de amina catalisadas pela mTGase.



Fonte: Miwa (2020) adaptado pelo autor.

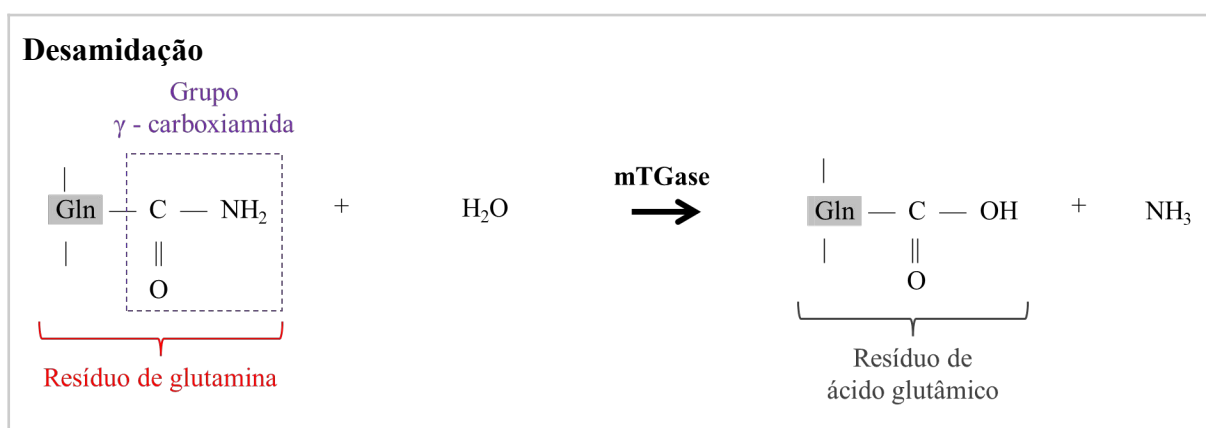
Figura 5 – Segunda etapa: reação de reticulação catalisadas pela mTGase.



Fonte: Miwa (2020) adaptado pelo autor.

Na ausência do grupo ϵ -amino (Figura 6), a água pode atuar como acil-receptor da reação e os grupos γ -carboxamida dos resíduos de glutamina são desamidados, resultando na formação de resíduos de ácido glutâmico, que podem modificar a carga e estabilidade proteica (Vasić; Knez; Leitgeb, 2023), sendo esses grupos carregados negativamente e, por isso, a capacidade das proteínas de se ligarem à água é aumentada (Altindağ *et al.*, 2015). A reação de reticulação catalisada pela TGase microbiana ocorre antes das reações de transferência e desamidação de acil em sistemas alimentares, o que resulta na formação de isopeptídeos e polímeros de glutamil-lisina (Gln-Lys) com alto peso molecular (Duarte *et al.*, 2020).

Figura 6 – Segunda etapa: reação catalisada pela mTGase na presença de água.



Fonte: Miwa (2020) adaptado pelo autor.

Dentre as três reações possíveis catalisadas pela mTGase, apenas a reação de formação da ligação cruzada (reticulação) intra ou intermolecular é de interesse na modificação das propriedades funcionais e tecnológicas de proteínas. No entanto, a reação entre os grupos γ -carboxiamida de um resíduo de Gln de uma proteína e aminas primárias é

uma alternativa interessante para aumentar o valor nutricional de proteínas vegetais devido à possibilidade de incorporar aminoácidos que são considerados limitantes (Dube, 2007).

3.2.1.2 Características da mTGase e fatores que influenciam a atividade catalítica

Além de ser independente do íon cálcio, a mTGase derivada da cepa *S. mobaraense* S-8112 é composta por uma única cadeia polipeptídica de 331 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de cerca 38 kDa, metade da massa molecular da TGase de mamíferos (70-80 kDa). A mTGase derivada de *S. mobaraense* é considerada estável em uma ampla faixa de pH. O pH ideal varia de 5 a 8, mas a enzima ainda mantém alguma atividade catalítica entre valores de pH 5 e 9, e seu ponto isoelétrico é igual a 9 (Miwa, 2020).

Ando *et al.* (1989), avaliaram a temperatura ótima de atividade da mTGase derivada de *S. mobaraense*, que foi de 50 °C, permanecendo totalmente ativa durante 10 minutos em pH 6, utilizando CBZ-glutamil glicina e hidroxilamina como substratos. De acordo com Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004), quando incubada a 70 °C, a enzima perde sua atividade em poucos minutos. A mTGase demonstra atividade mesmo a 10 °C, e em temperaturas ligeiramente acima do ponto de congelamento. A Tabela 1 apresenta uma comparação entre as TGases de origem animal e microbiana, destacando as principais diferenças entre elas.

Tabela 1 – Propriedades ótimas e características de transglutaminase de diferentes origens.

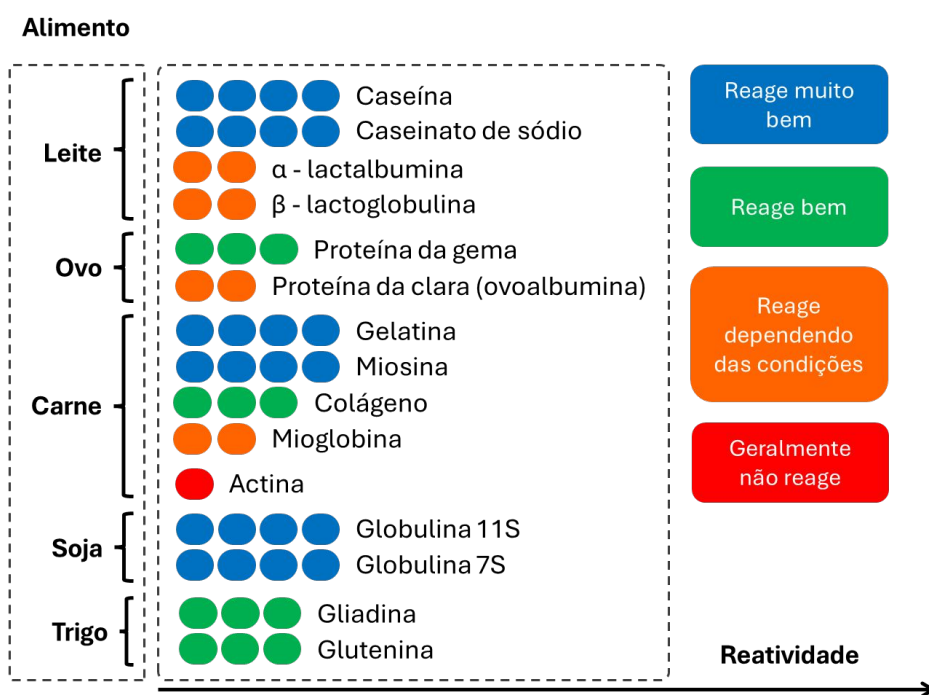
Parâmetro	Transglutaminase	
	Animal (fígado de porquinhos-da-índia)	Microbiana (<i>S. mobaraense</i>)
Faixa de temperatura (°C)	50 - 55	45 - 55
Faixa de pH	6 - 7,5	5 - 9
pH ótimo	6	5 - 8
Ponto isoelétrico	4,5	9
Peso molecular (Da)	76620	37862
Íon Ca ⁺²	Dependente	Independente

Fonte: Miwa (2020), adaptado pelo autor.

Com relação à sensibilidade da TGase microbiana, descobriu-se que os cátions Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Li^{+} inibem significativamente a atividade da enzima derivada de *S. mobaraense*. Esses metais, que se ligam ao grupo tiol (SH), sugerindo que o resíduo de Cys faz parte do sítio ativo da enzima (Motoki; Seguro, 1998). A inibição também acontece quando está em contato com o oxigênio, devido à oxidação do grupo sulfidríla (Góes-Favoni; Bueno, 2014).

Quanto à especificidade pelo substrato, a maioria das proteínas de matrizes alimentares podem ser reticuladas pela mTGase. Isso inclui caseínas de leite, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, proteínas de gema e clara de ovo, actinas, miosinas e fibrinas, globulinas de leguminosas, glúten de trigo, (conforme a Figura 7, que indica qualitativamente a reatividade) e a independência de cálcio como cofator é altamente significativo, pois algumas proteínas (como a caseína, miosina e globulina de soja) podem ser precipitadas indesejavelmente na presença desse íon (Motoki; Seguro, 1998; Yokoyama; Nio; Kikuchi, 2004).

Figura 7 – Reatividade da TGase derivada de *S. mobaraense* com proteínas alimentares.



Fonte: Vasić; Knez e Leitgeb (2023), adaptado pelo autor.

3.2.1.3 Aplicações na área de alimentos e legislação brasileira

A transglutaminase pode ser a solução para muitos problemas tecnológicos no setor alimentício, tendo em vista sua capacidade de formar ligações covalentes entre as cadeias

laterais dos resíduos dos aminoácidos Gln e Lys. No mercado, existem diversas preparações enzimáticas de TGase que são obtidas a partir de biossíntese via *Streptoverticillium mobaraense* (Kieliszek; Misiewicz, 2014), e a marca ACTIVA[®], da Ajinomoto Food Ingredients, foi a pioneira no mundo na produção de mTGase para aplicações alimentícias, e começou a ser comercializada no Brasil em 1998 (AJINOMOTO, 2018).

Desde então, o Grupo Ajinomoto passou a desenvolver outras aplicações e novas preparações enzimáticas ACTIVA[®], em resposta às necessidades da indústria de alimentos e, atualmente, existem preparações destinadas aos produtos cárneos, lácteos, *plant-based*, panificados e massas. No Brasil, conforme definido no Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n.º 728, de 1º de julho de 2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2022), o uso de transglutaminase na indústria alimentícia é permitido, desde que seja obtida exclusivamente a partir dos microrganismos *Streptoverticillium mobaraense* ou *Streptomyces mobaraense*.

Nesse caso, conforme definido na RDC n.º 728, de 1º de julho de 2022, é autorizado o uso da enzima TGase para a elaboração de preparação enzimática para o uso como coadjuvante de tecnologia de fabricação para a produção de alimentos destinados ao consumo humano. De acordo com a RDC n.º 778, de 1º de março de 2023 da ANVISA, coadjuvante de tecnologia de fabricação é definido como:

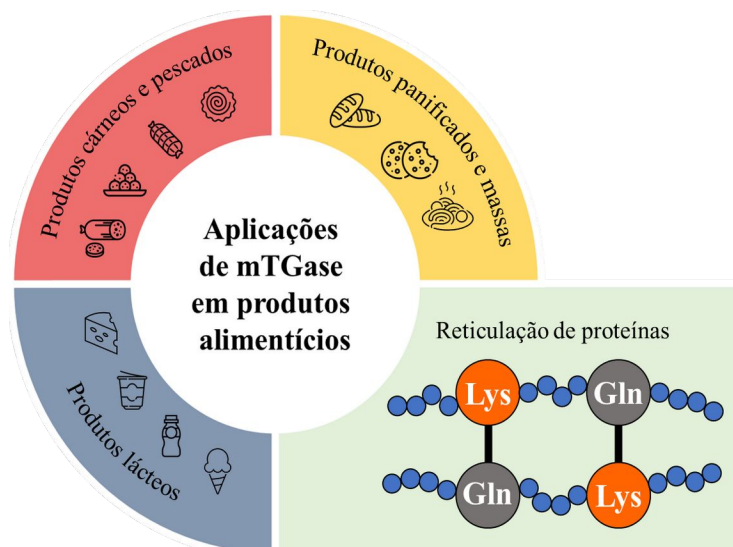
Toda substância ou matéria, excluídos equipamentos e utensílios, que não se consome como ingrediente por si só e que se utiliza intencionalmente na elaboração de matérias-primas, ingredientes ou alimentos, para alcançar uma finalidade tecnológica durante seu tratamento ou elaboração, podendo resultar na presença não intencional, porém inevitável, de resíduos ou derivados no produto final.

A regulamentação atualmente vigente sobre os Requisitos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ) dos presuntos (Portaria da Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA n.º 765, de 6 de abril de 2023), aprovada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) do Brasil, por exemplo, permite o uso da transglutaminase como coadjuvante de tecnologia na fabricação desse tipo de produto. Sendo assim, é importante que o RTIQ de outros tipos de alimentos possa prever o uso da TGase microbiana, visto que é um indicativo das vantagens tecnológicas da sua aplicação.

O sucesso da mTGase está no desenvolvimento de aplicações no processamento de alimentos e suas preparações enzimáticas são fundamentais para a indústria, destacando-se pela sua praticidade e benefícios tecnológicos. Muitos estudos exploram o uso de mTGase em vários campos, especialmente na área alimentícia, envolvendo a reticulação de proteínas

(Figura 8), devido à sua capacidade de aprimorar diversas propriedades das proteínas alimentares sem afetar ou até mesmo melhorar o valor nutricional do alimento, possibilitando também o desenvolvimento de produtos inteiramente novos, como filmes de proteína usados para fazer o revestimento de vegetais e frutas frescas e produtos alimentícios processados para estender sua vida de prateleira (Amirdivani *et al.*, 2018).

Figura 8 – Possibilidades de aplicações de mTGase na indústria alimentícia.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.1.3.1 Produtos à base de carne

A actina e a miosina, que constituem a maioria das proteínas miofibrilares, são substratos importantes que têm influência significativa na qualidade da textura de produtos cárneos e podem ser reticuladas pela mTGase. A indústria de carnes é uma das áreas mais promissoras para essa enzima, especialmente em produtos reestruturados, os quais auxiliam na produção de alimentos à base de carne bovina, suína, de aves e de pescado, permitindo usar matérias-primas de qualidade inferior (carne mecanicamente separada, colágeno e proteínas do sangue), para produzir produtos com maior valor nutricional, complementando-os com aminoácidos essenciais (lisina exógena) (Kolotylo; Piwowarek; Kieliszek, 2023).

Segundo Duarte *et al.* (2019), a reestruturação de carnes garante maior firmeza diminuindo a perda de qualidade durante o cozimento do produto, e a reticulação de proteínas e outros compostos do sistema de gel provoca alterações no conteúdo proteico da matriz alimentar, obtendo melhoria na textura, estabilidade térmica, propriedades emulsificantes,

gelificação e aumento da capacidade de retenção de água (CRA), resultando em um produto com propriedades sensoriais semelhantes aos convencionais.

A mTGase proporciona uma forte ligação entre pedaços de carne sem a necessidade de tratamento térmico, ou adição de sal e fosfatos. A redução do teor de sódio em produtos cárneos interfere diretamente na qualidade, resultando na menor extração proteica e, conseqüentemente, menor poder de ligação. No entanto, como estratégia, a indústria de carnes processadas tem utilizado essa enzima em produtos com baixo teor de sódio, pois, além de contribuir com a melhoria da textura, atende aos requisitos dos consumidores, devido à preocupação com a saúde relacionada ao elevado teor de sódio em sua formulação dos alimentos (Kolotylo; Piwowarek; Kieliszek, 2023).

3.2.1.3.2 Produtos à base de leite

A qualidade e funcionalidade de produtos lácteos são consideradas fatores importantes, principalmente para a melhor apreciação dos consumidores. Como estratégia para alcançar melhores propriedades biofuncionais, nutricionais e tecnológicas, a reticulação de proteínas por transglutaminase tem sido favorável. Ao mesmo tempo, pode proporcionar a redução de custos relacionados à produção, possibilitando a diminuição da quantidade de gordura e estabilizante no produto final, pois tanto a caseína quanto a α -lactalbumina e β -lactoglobulina do soro de leite são excelentes substratos receptores e/ou aceptores de acil para a TGase (Duarte *et al.*, 2019; Kolotylo; Piwowarek; Kieliszek, 2023).

Embora existam algumas diferenças entre as proteínas do leite em relação à reação de reticulação, os benefícios trazidos pela aplicação de mTGase em produtos lácteos incluem aumento da resistência do gel e melhoria da estabilidade e viscosidade de armazenamento (Duarte *et al.*, 2019). As caseínas, principais proteínas do leite, são excelentes substratos para a mTGase, devido ao baixo grau de estrutura terciária, flexibilidade e ausência de quaisquer ligações dissulfeto nas α_{s1} -caseína e β -caseína, permitindo que os grupos reativos estejam expostos (Romeih; Walker, 2017).

Em comparação com as caseínas, as proteínas globulares do soro de leite (estabilizadas por ligações dissulfeto), no seu estado nativo, são substratos menos eficazes para a ação da TGase. Por conta disso, requerem modificações preliminares que podem ser alcançadas por desnaturação térmica, agentes redutores, aumento do valor do pH ou pela aplicação de alta pressão hidrostática. Esses tratamentos, além de afetarem as interações entre a mTGase e seus inibidores presentes no soro do leite, induzem a desnaturação proteica do

soro e/ou clivagem das ligações dissulfeto, causando o desdobramento das proteínas do soro e a exposição de potenciais regiões para reticulação (Vasić; Knez; Leitgeb, 2023; Romeih; Walker, 2017).

A cremosidade, homogeneidade, suavidade e consistência em coalhada, sorvete, leite e queijo, podem ser alcançadas através da reticulação. A mTGase pode melhorar a CRA do gel de iogurtes, por exemplo, que têm como desvantagem a sinérese mediante mudança de temperatura ou impacto físico (Fátima; Khare, 2018). Já com relação aos sorvetes, estruturados pela ação de proteínas do leite, que contribuem para a formação e coalescência parcial da estrutura gordurosa (adsorvidas na interface do ar, levando à aeração e estabilidade da espuma), com a aplicação da mTGase, pode melhorar sua consistência, devido aos polímeros de alto peso molecular formados por reticulação (Góes-Favoni; Bueno, 2014).

3.2.1.3.3 Produtos à base de cereais e leguminosas

Em todo o mundo, produtos à base de cereais têm sido consumidos como alimento básico em diversas formas, como fonte de energia e nutrientes, incluindo produtos de panificação, massas, salgadinhos, cereais matinais e outros. No caso de pães, o glúten é responsável pela viscoelasticidade e consistência únicas da massa de trigo e pela textura do produto e da massa resultante. Quanto aos alimentos sem glúten, pães e biscoitos são os mais consumidos mundialmente, e são preparados principalmente com farinhas isentas de glúten, como cereais (milho, arroz, sorgo), pseudocereais (amaranto, trigo sarraceno, quinoa) e leguminosas (grão de bico, soja) (XU *et al.*, 2020).

A doença celíaca (DC), prevalente em cerca de 1% da população mundial, é uma intolerância permanente a determinadas prolaminas, em diferentes graus, caracterizada por atrofia da mucosa do intestino delgado e, conseqüentemente, má absorção de nutrientes. O único tratamento eficaz para a DC é a adesão estrita a uma dieta isenta de glúten durante toda a vida (Góes-Favoni; Bueno, 2014). A disponibilidade diversificada de produtos de panificação sem glúten aumenta a escolha para indivíduos que possuem alguma restrição (XU *et al.*, 2020). No entanto, essa substituição do glúten é o principal problema tecnológico no processamento de panificados e, por isso, a mTGase se tornou atraente para essa área.

A aplicação de mTGase em proteínas de cereais de trigo (especialmente em globulinas, gluteninas, gliadinas, prolaminas) tem atraído enorme interesse da indústria de panificação, pois tem a vantagem de melhorar as propriedades funcionais e o comportamento da massa, incluindo estabilidade, elasticidade, resiliência e adsorção de água (com tamanho de

poro e volume de massa adequados), determinando sua qualidade, à medida que ocorrem ligações cruzadas entre as cadeias polipeptídicas de prolamina (Fátima; Khare, 2018; Kolotylo; Piwowarek; Kieliszek, 2023).

A modificação do glúten, realizada por meio da formação de ligações cruzadas usando mTGase, pode reduzir a imunorreatividade associada à doença celíaca (Singla, 2024). Segundo o autor, a transamidação de resíduos de gliadina em farinha de trigo está ligada ao éster alquílico de lisina, resultou em uma redução na resposta inflamatória em pacientes intolerantes ao glúten. A farinha de trigo mediada por mTGase promove a formação de glúten transamidado solúvel, resultando em um produto de glúten significativamente reduzido. Além disso, este produto processado demonstra uma incapacidade de ativar a resposta inflamatória associada à gliadina. Esta abordagem pode ser uma estratégia promissora para aumentar o valor nutricional e sensorial de alimentos livres de glúten.

Pesquisadores utilizaram farinhas com e sem glúten (farinhas de trigo, cevada e soja e suas misturas), confirmando a polimerização das proteínas dessas farinhas a partir da mTGase, em que houve o aumento da CRA, adsorção de gordura e estabilidade da emulsão. Foi sugerido que a ligação cruzada de proteínas com a mTGase pode produzir funcionalidade única e aprimorada, proporcionando oportunidades de uso dessa enzima em novos produtos, mesmo em trigo misturado com farinha de cevada ou soja (Amante; Fante; Pires, 2020).

Com relação à CRA em emulsões e espumas, Gaspar e Góes-Favoni (2015), em sua revisão, relataram que diminuiu a perda durante o cozimento do pão de farinha de trigo sarraceno e de arroz integral com mTGase adicionada, indicando um aumento na CRA das proteínas. Isso foi atribuído à desamidação dos resíduos de glutamina, aumentando a hidrofiliabilidade da proteína, aliada à forte estrutura gel resultante da polimerização entre as proteínas. Assim, tanto as reações de desamidação quanto a formação de ligações cruzadas catalisadas pela mTGase, influenciam diretamente a CRA em diferentes substratos proteicos.

Devido à natureza complexa das proteínas do farelo de arroz, a disponibilidade de concentrados e isolados comerciais de farelo de arroz é limitada. O teor de proteína bruta no arroz (em torno de 5 a 10%) é significativamente menor em comparação com outros grãos. As proteínas do arroz por si só não são capazes de formar uma estrutura forte o suficiente para reter o gás produzido durante a fermentação. Entretanto, é importante notar que o teor de lisina, um dos substratos adequados para reações de reticulação de proteínas com mTGase, é mais de 50% maior em comparação ao trigo (Kolotylo; Piwowarek; Kieliszek, 2023).

Vale ressaltar que o efeito da mTGase depende da sua concentração, da qualidade da farinha de trigo e da fonte de proteína utilizada na formulação, podendo ser observado um

efeito negativo em níveis mais elevados da enzima no volume de pães, por exemplo, devido à reticulação adicional, resultando numa massa forte (Akbari; Razavi; Kieliszek, 2021). A ação da mTGase foi testada em macarrão instantâneo e massas, que apresentaram maior resistência mesmo quando utilizado farinha de baixa qualidade, evitando a deterioração da textura durante o cozimento, mantendo sua firmeza e elasticidade (Fátima; Khare, 2018).

A proteína isolada de soja é amplamente usada como ingrediente nas dietas ou em alimentos processados, por conta do seu valor nutricional e propriedades funcionais. As globulinas 11S e 7S (glicinina e β -conglucina, respectivamente), constituem cerca de 70% do conteúdo total de proteínas da soja, e são bons substratos para a mTGase (Kolotylo; Piwowarek; Kieliszek, 2023). Um produto típico da soja, o tofu, é obtido através da coagulação com adição de Ca^{2+} , Mg^{2+} e/ou glucono- δ -lactona, sendo difícil produzir um produto de longa duração, pois a textura macia e suave é facilmente destruída pela etapa de esterilização. Porém, essa textura macia do tofu esterilizado pode ser mantida por muito mais tempo com a adição da mTGase (Motoki; Seguro, 1998; Yokoyama; Nio; Kikuchi, 2004).

Altındağ *et al.* (2015), em sua pesquisa, utilizaram diversas combinações de diferentes tipos de farinha (trigo sarraceno, milho e arroz) e avaliou o efeito da farinha e da adição de mTGase na qualidade de biscoito. O teor de umidade e a proporção de espalhamento dos biscoitos preparados com adição da enzima foram superiores aos dos biscoitos preparados sem adição da mTGase. A adição dessa enzima teve um efeito significativo nas propriedades texturais (dureza e fraturabilidade), e os biscoitos adicionados de mTGase eram mais macios, porém mais quebradiços.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises deste estudo foram realizadas em laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), abrangendo o Laboratório de Óleos e Gorduras (LOG), Laboratório de Panificação da Usina Piloto de Alimentos, Laboratório de Frutas e Hortaliças (LFH) e Laboratório de Análises de Alimentos (LABCAL) do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA); e o Laboratório 2 da Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos (EQA), do Centro de Tecnológico (CTC).

4.1 ELABORAÇÃO DOS BISCOITOS

4.1.1 Material

A castanha-do-brasil foi recebida de doação da indústria brasileira Uniagro Ind. Com. Produtos Alimentícios Ltda. (Porto Alegre, RS), e armazenada em temperatura de congelamento (-18 °C) até sua utilização. A gordura vegetal foi obtida através de doação da indústria brasileira Cargill. Os demais ingredientes utilizados para elaboração dos biscoitos (farinha de arroz, fécula de mandioca, amido de milho, dentre outros) foram adquiridos no comércio local da cidade de Florianópolis, SC.

O preparado enzimático da marca ACTIVA STG-F, à base de transglutaminase microbiana (proveniente do microrganismo *Streptomyces mobaraense*), desenvolvido pela Ajinomoto do Brasil, foi recebido como doação. Segundo o fabricante, esse preparado enzimático é indicado para aplicações em farinhas, massas e produtos panificados, e contém em sua formulação maltodextrina, proteína isolada de trigo e o coadjuvante de tecnologia transglutaminase ($\geq 0,1\%$). Além disso, em sua embalagem, consta que o preparado enzimático contém glúten em sua composição.

4.1.2 Pesagem do preparado enzimático

Devido à pequena quantidade de mGTase estabelecida para as formulações dos biscoitos, a enzima foi misturada com amido de milho na proporção de 1:4 (m/m). Em seguida, a enzima foi testada na dosagem mínima e máxima recomendadas pelo fabricante

(0,0085% e 0,0140%, m/m, respectivamente), com base na quantidade de *mix* de farinha da formulação dos biscoitos (farinha de arroz e de castanha-do-brasil, fécula de mandioca e amido de milho).

4.1.3 Obtenção da farinha de castanha-do-brasil

A obtenção da farinha de castanha-do-brasil seguiu a metodologia descrita por Polmann *et al.* (2019). As amêndoas foram previamente aquecidas a 40 °C por 2 horas e prensadas 3 vezes consecutivas até 10 ton em prensa hidráulica (Te 098 - Tecnal[®], Piracicaba, Brasil, carga máxima 16 ton) no laboratório LOG do CAL/CCA/UFSC. A torta de prensagem (coproduto da castanha-do-brasil) foi moída, peneirada, embalada em sacos plásticos (Nylon Poli, 12 mm) a vácuo e armazenada a -18 °C até posterior utilização. Esse procedimento de padronização foi definido em estudo em andamento no grupo de pesquisa (Fabri, 2024).

4.1.4 Preparo dos biscoitos

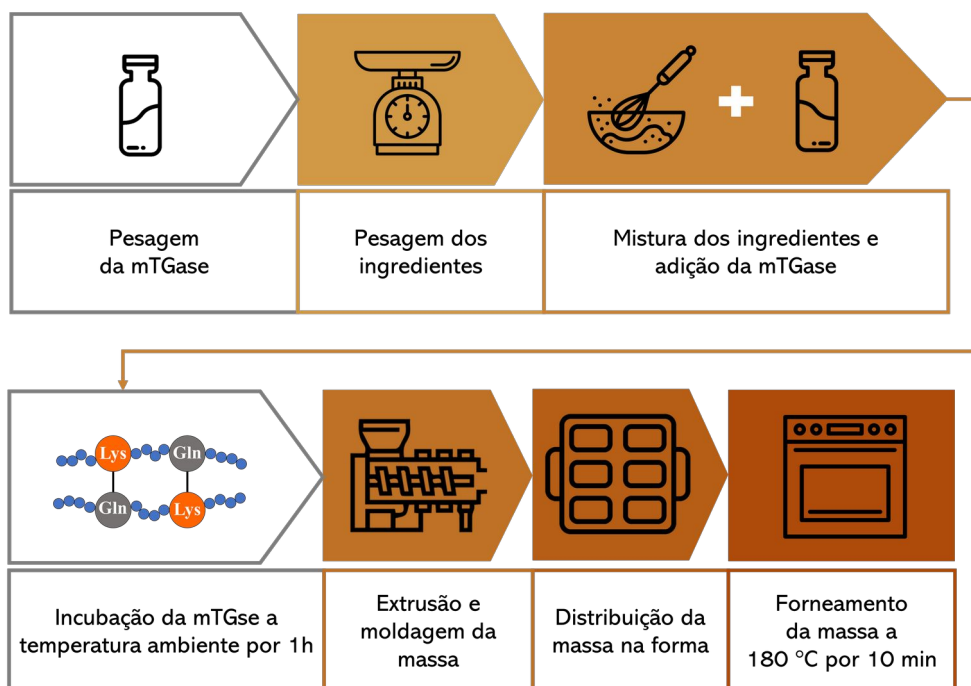
Os biscoitos foram elaborados de acordo com dissertação do grupo de pesquisa que está em andamento (ainda não publicada), sem ajustes na formulação (Fabri, 2024). No entanto, foi estabelecida a adição de duas diferentes concentrações enzimáticas de 0,0085% e 0,0140% (ou 85 ppm e 140 ppm, respectivamente, valores de concentração mínima e máxima sugeridos pelo fabricante) com base na quantidade de farinha utilizada, além da formulação Controle (sem enzima), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Formulações de biscoitos sem glúten sem enzima (Controle) e com adição de 85 ppm e 140 ppm (C85 e C140, respectivamente) de mTGase.

Ingrediente	Formulação (g/100 g)		
	Controle	C85	C140
Mix de farinha (exceto amido)	64,33	64,33	64,33
Amido de milho	12,17	12,17	12,17
Gordura vegetal	11,00	11,00	11,00
Demais ingredientes	12,50	12,50	12,50
mTGase	0,00	0,0065	0,0107
Água	32,5	32,5	32,5

As etapas para a elaboração dos biscoitos (Figura 9), realizadas na usina de Panificação da Usina Piloto de Alimentos do CAL/CCA/UFSC, seguem procedimento definido na dissertação em andamento no grupo de pesquisa (Fabri, 2024). Após a adição da transglutaminase microbiana, a enzima foi incubada durante 1 (uma) hora à temperatura ambiente, para garantir sua ação.

Figura 9 – Etapas de elaboração dos biscoitos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DOS BISCOITOS

4.2.1 Atividade de água

A atividade de água (A_w) das três formulações de biscoitos foi determinada utilizando um higrômetro digital (Aqualab, Modelo Series 4 TE, Decagon Devices, Inc., Pullman, EUA) do laboratório LABCAL do CAL/CCA/UFSC, calibrado com água destilada ($A_w = 1,00$), pela medida do ponto de orvalho a 25 °C. As amostras de biscoito foram moídas e analisadas em triplicata para cada formulação (Controle, C85 e C140) um dia após o preparo dos biscoitos.

4.2.2 Cor instrumental

A cor dos biscoitos foi medida de acordo com o sistema CIELab através de um colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-400, Osaka, Japão) do LFH do CAL/CCA/UFSC. Os resultados obtidos foram expressos em termos de valores L^* (luminosidade), a^* (vermelho para verde, valores positivos para negativos, respectivamente) e b^* (amarelo para azul, valores positivos para negativos, respectivamente). A partir disso, o índice de escurecimento (IE) de dez biscoitos de cada formulação ($n = 10$) foi calculado através da Equação 1 (Shaabani *et al.*, 2018), parâmetro importante associado ao escurecimento que representa a pureza da cor marrom.

$$IE = \frac{100}{0,17} \left(\frac{a^* + 1,75 L^*}{5,645 L^* + a^* - 3,012 b^*} \right) - 0,31 \quad (1)$$

4.2.3 Teste de resistência ao corte

O teste de corte seguiu a metodologia descrita por Martendal *et al.* (2023) modificada. Um dia após o preparo dos biscoitos, dez unidades de cada formulação ($n = 10$) selecionadas aleatoriamente, foram analisadas em um texturômetro TA-XT2-Plus (*Stable Micro Systems*, Godalming, UK) no laboratório da Central de Análises do CTC/EQA/UFSC, com célula de carga de 50 kg, equipado com uma lâmina de cisalhamento Warner-Bratzler (*probe* em formato de forquilha, “V” invertido, de 45 mm, com ajustes de velocidade pré-teste de 2 mm/s, velocidade de teste de 1 mm/s, velocidade pós-teste de 10 mm/s, força de contato de 7 g e distância de 15 mm). A dureza correspondeu ao pico máximo, no primeiro ciclo de compressão.

4.2.4 Teste de perfuração

O teste de perfuração seguiu a metodologia descrita por Tyagi *et al.* (2007). Aleatoriamente, dez amostras de biscoitos de cada formulação foram selecionadas ($n = 10$) e analisadas em texturômetro TA-XT2-Plus (*Stable Micro Systems*, Godalming, UK) equipado com uma agulha de perfuração e com configuração de velocidade pré-teste de 2 mm/s, velocidade de teste de 3,5 mm/s, velocidade pós-teste de 10 mm/s, e célula de carga de 50 kg, com deformação definida em 60%. A curva de força *versus* distância obtida, a dureza do

biscoito corresponde à força máxima e a resistência à perfuração foi considerada como a área sob a curva.

4.2.5 Dimensões e fator de expansão dos biscoitos

No plano vertical, a espessura dos biscoitos foi determinada a partir da média da altura de dois pontos centrais e dos quatro pontos mais altos das extremidades dos biscoitos. Já com relação ao plano horizontal, para cada lado dos biscoitos, foram medidos a largura e o comprimento de cada extremidade e calculada a média desses quatro pontos. As dimensões foram medidas com um paquímetro com precisão de 0,05 mm.

O fator de expansão (FE), ou também chamado de taxa ou fator de espalhamento, foi determinado conforme a metodologia descrita por Liu *et al.* (2021) com modificações. Dez amostras de cada formulação de biscoitos foram selecionadas de maneira aleatória após o forneamento ($n = 10$), sendo determinado o FE pela razão entre o valor médio das medidas horizontais de largura e comprimento (H), e o valor médio das medidas verticais de espessura (V), foram calculadas através da Equação 2:

$$FE = \frac{H}{V} \quad (2)$$

4.2.6 Perda de massa

Para cada formulação de biscoitos elaborada, dez amostras foram selecionadas de maneira aleatória ($n = 10$) e realizadas as pesagens em balança analítica digital, antes (massa M_i correspondente aos biscoitos crus) e após a etapa de forneamento (massa M_f dos biscoitos assados), onde foram anotados os valores e calculada a perda de massa (PM) através da Equação 3 para posterior avaliação:

$$PM = M_f - M_i \quad (3)$$

4.2.7 Análise do perfil de textura da massa crua

A análise do perfil de textura, ou TPA (do inglês *Texture Profile Analysis*), da massa crua foi determinada de acordo com Martendal *et al.* (2023) modificado. Dez amostras de massa de cada formulação, com cerca de 15 g cada ($n = 10$), foram preparadas, modeladas em formato esférico e analisadas no mesmo dia em um texturômetro TA-XT2-Plus (*Stable Micro Systems*, Godalming, UK). O equipamento foi ajustado com célula de carga de 50 kg. Para o teste, foi utilizada uma sonda cilíndrica de 35 mm de diâmetro, com velocidade pré-teste de 2 mm/s, velocidade de teste de 1 mm/s, velocidade pós-teste de 4,5 mm/s, força de contato de 7 g e distância de 4 mm.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software *Statistica* versão 13.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, USA) foi utilizado para tratar os dados quantitativos das análises realizadas e a diferença entre as amostras foi avaliada pela Análise de Variância (ANOVA) unidirecional, seguida do teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão amostral, utilizando-se critério de 95% de confiança. Para avaliação, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todas as comparações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE DE ÁGUA

Todas as amostras apresentaram A_w inferior a 0,2 e apresentaram diferença estatística significativa entre si ($p \leq 0,05$), sendo que houve aumento nos valores de A_w com o aumento da concentração de mTGase (Tabela 3). De acordo com Labuza e Altunakar (2020), alimentos com valores de A_w menores do que 0,2 (caracterizado como alimentos muito secos) são mais propensos apenas à degradação causada pela oxidação lipídica. Porém, esses valores são favoráveis para evitar o crescimento microbiano ($A_w \leq 0,6$), escurecimento e reações enzimáticas ($A_w < 0,2$) e as mudanças de estado físico, como a perda de crocância ($A_w < 0,35$ e $A_w > 0,45$).

Tabela 3 – Atividade de água das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.




Amostra	Atividade de água
Controle	0,0878 ± 0,0055 ^c
C85	0,1413 ± 0,0075 ^b
C140	0,1557 ± 0,0021 ^a

Controle - formulação isenta de mTGase (0 ppm); C85 - formulação com 85 ppm de mTGase; C140 - formulação com 140 ppm de mTGase. Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 10). Médias com letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

5.2 COR INSTRUMENTAL

Como é possível observar na Tabela 4, os parâmetros colorimétricos instrumentais das diferentes formulações de biscoito tratadas com e sem mTGase, nos valores de L^* , a formulação com C140 apresentou diferença estatística entre as demais formulações ($p \leq 0,05$). As amostras Controle e C85 não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), o que indica que a baixa concentração de enzima não afeta essa característica. Em contrapartida, a formulação C140 apresentou coloração significativamente mais clara em relação ao Controle e C85 ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 – Parâmetros colorimétricos das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.

Amostra	Parâmetros colorimétricos			Índice de escurecimento	Foto do biscoito
	L^*	a^*	b^*		
Controle	58,51 ± 0,88 ^b	6,12 ± 0,63 ^a	20,68 ± 0,89 ^a	50,58 ± 3,91 ^a	
C85	59,47 ± 0,90 ^b	4,95 ± 0,40 ^b	19,00 ± 0,55 ^b	43,94 ± 2,31 ^b	
C140	60,53 ± 1,01 ^a	4,61 ± 0,53 ^b	18,73 ± 1,10 ^b	42,03 ± 3,74 ^b	

Controle - formulação isenta de mTGase (0 ppm); C85 - formulação com 85 ppm de mTGase; C140 - formulação com 140 ppm de mTGase. Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 10). Médias com letras diferentes sobrescritas em cada coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Em relação às coordenadas a^* e b^* , para valores positivos, que diz respeito à tendência à coloração vermelha e amarela, respectivamente, o Controle se mostrou estatisticamente diferente com relação às demais amostras ($p \leq 0,05$), apresentando maior tendência a essas cores. No entanto, as amostras C85 e C140 não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$), indicando que a adição da mTGase na formulação desses biscoitos possui pouca influência na tendência às cores vermelha e amarela.

Acerca do índice de escurecimento (IE), um parâmetro que representa a pureza da cor marrom, as amostras com enzima não tiveram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), mas em relação à formulação Controle, a adição de mTGase influenciou significativamente na diminuição do IE dos biscoitos ($p \leq 0,05$).

De maneira similar, ao avaliar o efeito da mTGase em combinação com isolado proteico de grão-de-bico (IPGB), na concentração 1,5% de enzima em relação à farinha e aumentando o nível de IPGB, Shaabani *et al.* (2018) observaram a diminuição do IE da crosta de *muffins* sem glúten à base de farinha de milho. Os resultados obtidos neste estudo corroboram as observações relatadas pelos autores citados, apontando que a diminuição do IE pode ser atribuída à formação da ligação cruzada de glutamina e lisina pela mTGase e o aumento da absorção de água. Devido a esses fatores, principalmente quanto à rede proteica formada, os autores sugeriram que menos aminoácidos (especialmente a lisina) foram disponibilizados para que ocorressem as reações de Maillard. No entanto, também notou-se que, na menor concentração de IPGB, ao aumentar a mTGase, o IE aumentou

significativamente, podendo ser pela presença de maltose na enzima comercial, aumentando as reações de escurecimento na crosta.

5.3 TESTE DE RESISTÊNCIA AO CORTE

Um dos principais fatores que contribuem para a qualidade e o consumo de biscoitos envolve as propriedades texturais. A dureza é uma das características texturais mais importantes para esse tipo de produto; é medida como a força máxima para quebrar o biscoito (Mancebo, Picón e Gomez, 2015). Assim, avaliando os biscoitos quanto a esse atributo, conforme apresentado na Tabela 5, o aumento da concentração de enzima na formulação provocou a diminuição na dureza dos biscoitos, e as formulações Controle e C140 apresentaram diferença estatística entre si ($p \leq 0,05$). No entanto, a amostra C85 não se diferenciou significativamente das demais amostras ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Teste de resistência ao corte das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.

Amostra	Dureza (N)	Resistência ao corte (N)
Controle	3499,02 ± 803,83 ^a	5490,53 ± 3299,24 ^a
C85	2813,65 ± 571,35 ^{a b}	5821,63 ± 4135,77 ^a
C140	2597,50 ± 830,95 ^b	5928,42 ± 7440,37 ^a

Controle - formulação isenta de mTGase (0 ppm); C85 - formulação com 85 ppm de mTGase; C140 - formulação com 140 ppm de mTGase. Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 10). Médias com letras diferentes sobrescritas em cada coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Altindağ *et al.* (2015) desenvolveram pesquisa com biscoitos sem glúten com diferentes farinhas e combinações delas (farinhas de trigo sarraceno; trigo sarraceno e milho; trigo sarraceno e arroz; trigo sarraceno, milho e arroz), testando a adição de mTGase a 0,002% com base na quantidade de farinha. A enzima causou diminuição nos valores de dureza, sugerindo que a aplicação da mesma resultou em melhor capacidade de retenção de água ao formar uma rede proteica. A diminuição na dureza pode ser considerada como consequência de um aumento no teor de umidade dos biscoitos atribuída às ligações isopeptídicas formadas pela TGase microbiana.

Além do mais, é notável que, apesar de haver uma tendência nos valores da força necessária para que ocorra o corte (ou ruptura) dos biscoitos ser maior conforme o aumento da

concentração de enzima, não houve influência significativa provocada pela mTGase entre as formulações testadas ($p > 0,05$).

Entretanto, as medidas instrumentais de textura atuam como uma ferramenta útil para estudar os perfis de dureza de uma amostra, contribuindo para a obtenção de parâmetros analíticos específicos, facilitando comparações. Contudo, é evidente que essas medições apresentam limitações ao tentar emular o comportamento distinto do alimento na boca. A percepção e avaliação humana da textura, em um contexto sensorial, são altamente sofisticadas, envolvendo interações complexas entre as propriedades das amostras e a forma como os sentidos trabalham na mente humana (Wesley, André e Clerici, 2021).

5.4 TESTE DE PERFURAÇÃO

Conforme apresentado na Tabela 6, com o aumento da concentração de TGase microbiana, as formulações não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), apesar da tendência de diminuição da força necessária para perfurar as amostras de biscoitos no teste (com valores variando entre 21,449 N e 17,228 N).

Tabela 6 – Teste de perfuração das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.

Amostra	Dureza (N)
Controle	21,449 ± 3,666 ^a
C85	18,827 ± 4,402 ^a
C140	17,228 ± 3,994 ^a

Controle - formulação isenta de mTGase (0 ppm); C85 - formulação com 85 ppm de mTGase; C140 - formulação com 140 ppm de mTGase. Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 10). Médias com letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

5.5 FATOR DE EXPANSÃO

O fator de expansão vem sendo comumente utilizado para prever a qualidade de biscoitos, que associa elevados valores a uma maior qualidade, proporcionando alto rendimento. Isso pode ser influenciado pelo baixo teor de glúten, entre outros fatores, o que geralmente leva à diminuição da expansão do biscoito (Gan *et al.*, 2023), o que pode ser uma tendência de biscoitos isentos de glúten. Assim, conforme apresentado na Tabela 7, apesar

dos valores serem ligeiramente maiores com a adição da mTGase, as amostras testadas não apresentaram diferença estatística entre si quanto ao fator de expansão ($p > 0,05$), ou seja, a ação da enzima não provocou efeito significativo nesse parâmetro. Além disso, como limitação dessa determinação, tem-se as irregularidades no formato dos biscoitos.

Tabela 7 – Medidas (vertical e horizontal) e fator de expansão das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.

Amostra	Medidas (cm)		Fator de expansão
	Vertical	Horizontal	
Controle	0,624 ± 0,014 ^a	3,121 ± 0,014 ^a	5,000 ± 0,108 ^a
C85	0,620 ± 0,020 ^a	3,100 ± 0,029 ^a	5,004 ± 0,106 ^a
C140	0,617 ± 0,013 ^a	3,304 ± 0,440 ^a	5,238 ± 0,556 ^a

Controle - formulação isenta de mTGase (0 ppm); C85 - formulação com 85 ppm de mTGase; C140 - formulação com 140 ppm de mTGase. Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 10). Médias com letras diferentes sobrescritas em cada coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

5.6 PERDA DE MASSA

Na etapa de forneamento, ocorre a perda de massa devido à condição a que o alimento é submetido, em que a alta temperatura faz com que ocorra a evaporação da água. Diante disso, com relação às formulações de biscoitos testadas, houve uma pequena diferença entre a perda de massa do Controle em relação às demais. No entanto, não houve diferença estatística entre todas as amostras analisadas ($p > 0,05$), como descrito na Tabela 8.

Tabela 8 – Perda de massa (em gramas) das amostras de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.

Amostra	Massa (g)		Perda de massa (g)
	Cru	Assado	
Controle	5,03 ± 0,18 ^a	3,76 ± 0,13 ^a	1,21 ± 0,21 ^a
C85	4,86 ± 0,17 ^{a b}	3,59 ± 0,12 ^b	1,28 ± 0,23 ^a
C140	4,79 ± 0,11 ^b	3,51 ± 0,06 ^b	1,28 ± 0,16 ^a

Controle - formulação isenta de mTGase (0 ppm); C85 - formulação com 85 ppm de mTGase; C140 - formulação com 140 ppm de mTGase. Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 10). Médias com letras diferentes sobrescritas em cada coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Mohammadi *et al.* (2015), ao testarem a adição da mTGase em dois níveis (1 e 10 U/g de proteína) em pães sem glúten utilizando goma guar, relataram que todas as amostras com a enzima apresentaram um aumento significativo no rendimento do pão em comparação ao controle, sugerindo que a mTGase melhora a interação entre proteínas e a água, inibindo a perda de umidade do pão durante o processo de cozimento, visto que o rendimento do pão está diretamente relacionado ao seu teor de umidade após o forneamento.

5.7 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA DA MASSA

No que diz respeito à TPA da massa, como pode-se observar na Tabela 9, a dureza das massas de cruas de biscoito aumentou à medida que houve o aumento da concentração da transglutaminase. Entretanto, as amostras contendo 0,0085% e 0,0140% de mTGase não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), mas ambas apresentaram diferença entre a amostra isenta de enzima ($p \leq 0,05$), ou seja, a amostra Controle apresentou maior maciez.

Tabela 9 – Análise do perfil de textura das amostras de massa crua de biscoito analisadas com diferentes concentrações de mTGase.

Amostra	Dureza (N)	Adesividade (N.s)	Coesividade	Elasticidade
Controle	2294,500 ± 454,840 ^b	-117,658 ± 120,493 ^a	0,0254 ± 0,001 ^a	0,453 ± 0,019 ^a
C85	2736,210 ± 358,187 ^a	-109,529 ± 89,123 ^a	0,0237 ± 0,002 ^{a,b}	0,447 ± 0,004 ^a
C140	3170,510 ± 360,798 ^a	-68,722 ± 69,290 ^a	0,0231 ± 0,002 ^b	0,450 ± 0,005 ^a

Controle - formulação isenta de mTGase (0 ppm); C85 - formulação com 85 ppm de mTGase; C140 - formulação com 140 ppm de mTGase. Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 10). Médias com letras diferentes sobrescritas em cada coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Já com relação à adesividade, houve um aumento nos valores conforme o aumento da concentração de enzima, mas as amostras não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$). Quanto à coesividade das amostras de biscoitos analisadas, ocorreu um decréscimo nos valores com o aumento da concentração de mTGase. Estatisticamente, as formulações Controle e C140 apresentaram diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$), enquanto a C85 não diferiu em comparação às amostras Controle e C140 ($p > 0,05$). Além disso, não houve influência do aumento da concentração da TGase microbiana na elasticidade da massa com relação ao Controle, não diferenciando-se estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

Assim, a partir do TPA, em relação à amostra Controle, os resultados indicam que a aplicação da mTGase influencia diretamente a textura da massa, podendo ser vantajoso para processamentos que exijam maior dureza e elasticidade, e menor coesão. Diante disso, Berk *et al.* (2024) mencionam que uma massa mais macia e menos coesa pode ser mais adequada para a formação da massa e modelagem, enquanto a adesividade reduzida facilita o manuseio e a operação de equipamentos.

6 CONCLUSÃO

A aplicação da transglutaminase microbiana (mTGase) nas concentrações testadas em biscoito sem glúten com farinha de castanha-do-brasil (0,0085% e 0,0140% de mTGase, com base no mix de farinha da formulação), resultou em alterações nas propriedades físico-químicas, decorrentes da formação de ligações cruzadas (reticulação). Essas mudanças podem representar uma abordagem promissora para a modificação de algumas características desse alimento.

Apesar de a enzima não ter tido influência estatística significativa nas propriedades de resistência ao corte e na perfuração, no fator de expansão, na perda de massa dos biscoitos, nem na adesividade da massa crua, os demais resultados obtidos destacam que a enzima foi capaz de modificar os parâmetros instrumentais de textura da massa crua (dureza e coesividade), além de promover alterações na coloração (reduzindo o índice de escurecimento) e na redução da dureza dos biscoitos ($p \leq 0,05$).

No entanto, são necessárias análises sensoriais dos biscoitos pelo consumidor, para que possam ser avaliados quanto à aceitabilidade dessas propriedades sensoriais alcançadas, pois são avaliações essenciais para avaliar como as modificações de um produto influenciam na percepção dos indivíduos. Portanto, o presente estudo reforça a relevância científica e industrial da mTGase aplicada em produtos panificados inovadores, apontando direções valiosas para futuras pesquisas e aplicações tecnológicas no setor alimentício, especialmente em produtos sem glúten, que apresentam desafios específicos na obtenção de textura e características sensoriais agradáveis.

REFERÊNCIAS

- AKBARI, Mehdi; RAZAVI, Seyed Hadi; KIELISZEK, Marek. Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 110, p. 458-469, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.036>. Acesso em: 03 de nov. 2023.
- ALTINDAĞ, Gülçin; CERTEL, Muharrem; EREM, Fundagül; KONAK, Ülgen İlknur. Quality characteristics of gluten-free cookies made of buckwheat, corn, and rice flour with/without transglutaminase. *Food Science and Technology International*, v. 21, n. 3, p. 213-220, 2015. DOI <https://doi.org/10.1177/1082013214525428>.
- AJINOMOTO. **Ajinomoto Food Ingredients celebra 20 anos da linha ACTIVA® com novidades**. São Paulo: Ajinomoto, 2018. 3 p. Disponível em: <https://www.ajinomoto.com.br/app/uploads/releases/food-ingredients/2018/ajinomoto-food-ingredients-celebra-20-anos-da-linha-activareg-com-novidades.pdf>. Acesso em: 16 de nov. de 2023.
- AMANTE, Patrícia R.; FANTE, Camila A.; PIRES, Renato L. Use of transglutaminase in bakery products. *Journal of Culinary Science & Technology*, v. 18, n. 6, p. 549-559, 2020. DOI <https://doi.org/10.1080/15428052.2019.1681045>.
- AMIRDIVANI, Shabboo *et al.* Effects of transglutaminase on health properties of food products. *Current Opinion in Food Science*, v. 22, p. 74-80, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.008>.
- ANDO, Hiroyasu *et al.* Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and biological chemistry*, v. 53, n. 10, p. 2613-2617, 1989. DOI <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869735>.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 728, de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre as enzimas e as preparações enzimáticas para uso como coadjuvantes de tecnologia na produção de alimentos destinados ao consumo humano. **Diário Oficial da União**. 2022. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6504113/%282%29RDC7282022COMP.pdf/aa29c8cc-3636-4cd5-bc07-2f9c335a01ad>.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 778, de 1º de março de 2023. Dispõe sobre os princípios gerais, as funções tecnológicas e as condições de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia em alimentos. **Diário Oficial da União**. 2022. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6561857/RDC7782023.pdf/a89bb838-62e4-4471-a28f-ff28e3e97241>.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.
- DENTI, A. F.; POLINA, C. C.; VANZ, J.; BERNARDI, J. L.; RAISEL, L. B.; PALAVICINI, S. M. S.; FEIDEN, T.; BACKES, G. T. Enzimas e suas aplicações com ênfase na indústria de alimentos. *Revista Perspectiva*, v. 46, n. 175, p. 51-68, 16 set. 2022. DOI <https://doi.org/10.31512/persp.v.46.n.175.2022.251.p.51-68>.

DUARTE, L.; MATTE, C. R., BIZARRO, C. V.; AYUB; M. A. Z. Review transglutaminases: part II - industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 11, p. 1-20, 26 de dez. de 2019. DOI <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2792-9>. Acesso em: 21 out. 2023.

DUARTE, L.; MATTE, C. R., BIZARRO, C. V.; AYUB; M. A. Z. Transglutaminases: part I - origins, sources, and biotechnological characteristics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 15, p. 1-17, 02 jan. 2020. DOI <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2791-x>. Acesso em: 21 out. 2023.

DUBE, M.; SCHÄFER, C.; NEIDHART, S.; CARLE, R. Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. *European Food Research and Technology*, v. 225, p. 287-299, 2007. DOI <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0401-2>. Acesso em: 28 de out. de 2023.

FAGERBERG, Jan. Innovation: A Guide to the Literature. *The Oxford Handbook of Innovation*, Oxford Handbooks Online, [S.L.], p. 1-26, 19 jan. 2006. Oxford University Press. DOI <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199286805.003.0001>. Acesso em: 19 de out de 2023.

FÁTIMA, Syeda W.; KHARE, Sunil K. Current insight and futuristic vistas of microbial transglutaminase in nutraceutical industry. *Microbiological Research*, v. 215, p. 7-14, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.001>. Acesso em 30 de out. de 2023.

GAN, Lu-Jing *et al.* Effect of particle size of Sargassum fusiforme residue powder on sugar-free cookies properties. *LWT*, v. 182, p. 114826, 2023. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114826>.

GASPAR, Ana L. C.; GÓES-FAVONI, Silvana P. de. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food chemistry*, v. 171, p. 315-322, 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.019>.

GÓES-FAVONI, Silvana P. de; BUENO, Fábio R. Microbial Transglutaminase: General Characteristics and Performance in Food Processing Technology. *Food Biotechnology*, v. 28, n. 1, p. 1-24, 27 de jan. de 2014. DOI <https://doi.org/10.1080/08905436.2013.870076>.

GUINÉ, R. P. F.; FLORENÇA, S. G., BARROCA, M. J., ANJOS, O. The duality of innovation and food development versus purely traditional foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 109, p. 16-24, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.010>. Acesso em: 4 out. 2023.

ITAL. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Indústria de alimentos 2030: ações transformadoras em valor nutricional dos produtos, sustentabilidade da produção e transparência na comunicação com a sociedade. Campinas/SP, 1. ed., São Paulo: Ital/Abia, 2020. 108 p. Disponível em: <https://ital.agricultura.sp.gov.br/industria-de-alimentos-2030/>.

IUBMB. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc. [Internet]. London: University of London, Queen Mary, Department of Chemistry; [Última atualização em 26 de julho de 2023; citado em 05 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://iubmb.qmul.ac.uk/>.

KIELISZEK, Marek; MISIEWICZ, Anna. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia microbiológica*, v. 59, p. 241-250, 2014. DOI <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0287-x>.

KOLOTYLO, V.; PIWOWAREK, K.; KIELISZEK, M. Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry. *Open Life Sciences*, v. 18, n. 1, p. 20220737, 2023. DOI <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0737>. Acesso em: 29 de out. de 2023.

LABUZA, Theodore P.; ALTUNAKAR, Bilge. Water activity prediction and moisture sorption isotherms. *Water activity in foods: fundamentals and applications*, cap. 7, p. 161-205, 2020.

LIU, Yuanxiao *et al.* Effects of superheated steam treatment of wheat on physicochemical properties of wheat flour and cracker quality. *Journal of cereal science*, v. 97, p. 103165, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103165>.

MANCEBO, Camino M.; PICÓN, Javier; GÓMEZ, Manuel. Effect of flour properties on the quality characteristics of gluten free sugar-snap cookies. *LWT - Food Science and Technology*, v. 64, n. 1, p. 264-269, 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.057>.

MAPA. Ministro da Agricultura e Pecuária. **Portaria SDA n.º 765, de 6 de Abril de 2023.** Aprova os Requisitos Técnicos de Identidade e Qualidade do presunto cozido, presunto cozido superior, presunto cozido tenro e do presunto cozido de aves. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-sda-n-765-de-6-de-abril-de-2023-477630109>.

MARTENDAL, Leticia F. *et al.* Formulation of nutritious gluten-free cookies with upcycled pecan nut cake flour. *JSFA Reports*, v. 3, n. 3, p. 129-136, 2023. DOI <https://doi.org/10.1002/jsf2.104>.

MIWA, Noriko. Innovation in the food industry using microbial transglutaminase: Keys to success and future prospects. *Analytical Biochemistry*, v. 597, p. 113638, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113638>. Acesso em: 15 de out de 2023.

MOHAMMADI, Mehrdad *et al.* Development of gluten-free bread using guar gum and transglutaminase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 21, p. 1398-1402, 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.06.013>.

MOTOKI, Marsao; SEGURO, Katsuya. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, n. 5, p. 204-210, 1998. DOI [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00038-7). Acesso em: 02 de nov. de 2023.

PACHECO, A. F. C.; CUNHA, J. S.; PACHECO, F. C.; PAIVA, P. H. C.; JÚNIOR, B. R. C. L. Aplicações de Enzimas na Indústria de Alimentos: Revisão. *Pesquisas e Atualizações em Ciência dos Alimentos*, [s.l.], p. 84-92, 10 mar. 2022. Agron Food Academy. DOI <http://dx.doi.org/10.53934/9786599539657-9>. Acesso em: 14 out. 2023.

POLMANN, Gabriela *et al.* Enzyme-assisted aqueous extraction combined with experimental designs allow the obtaining of a high-quality and yield pecan nut oil. *LWT*, v. 113, p. 108283, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108283>.

ROMEIH, Ehab; WALKER, Gavin. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. *Trends in food science & technology*, v. 62, p. 133-140, 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.015>.

SHAABANI, Sanaz *et al.* The effect of chickpea protein isolate in combination with transglutaminase and xanthan on the physical and rheological characteristics of gluten free muffins and batter based on millet flour. *LWT*, v. 90, p. 362-372, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.023>.

SINGLA, Deepika *et al.* Advances in understanding wheat-related disorders: A comprehensive review on gluten-free products with emphasis on wheat allergy, celiac and non-celiac gluten sensitivity. *Food Chemistry Advances*, v. 4, p. 100627, 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100627>.

TYAGI, S. K. *et al.* Effect of mustard flour incorporation on nutritional, textural and organoleptic characteristics of biscuits. *Journal of Food Engineering*, v. 80, n. 4, p. 1043-1050, 2007. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.08.016>.

VASIĆ, K.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Transglutaminase in Foods and Biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 15, p. 12402, 3 ago. 2023. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms241512402>. Acesso em: 27 de out. de 2023.

WESLEY, Silva David; ANDRÉ, Bolini Helena Maria; CLERICI, Maria Teresa Pedrosa Silva. Gluten-free rice & bean biscuit: characterization of a new food product. *Heliyon*, v. 7, n. 1, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05956>.

XU, Jingwen; ZHANG, Yiqin; WANG, Weiqun; LI, Yonghu. Advanced properties of gluten-free cookies, cakes, and crackers: A review. *Trends in food science & technology*, v. 103, p. 200-213, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.017>.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, p. 447-454, 22 de jan. 2004. DOI <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1539-5>.

ZHAO, L.; CHEN, M.; BI, X.; DU, J. Physicochemical properties, structural characteristics and in vitro digestion of brown rice-pea protein isolate blend treated by microbial transglutaminase. *Food Hydrocoll*, v. 141, p. 108673, 2023. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108673>. Acesso em: 29 de out. de 2023.

ZUIN, L. F. S.; ZUIN, P. B. Produção de alimentos tradicionais contribuindo para o desenvolvimento local/regional e dos pequenos produtores rurais. *Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional*, [s.l.], v. 4, n. 1, 2008. DOI <https://doi.org/10.54399/rbgdr.v4i1.117>. Acesso em: 4 out. 2023.