

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO - PPGAN  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

Ana Carolina Vieira Porto

**UTILIZAÇÃO DA ASPARAGINASE NA PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE  
ACRILAMIDA EM CAFÉ**

Rio de Janeiro

2015

Ana Carolina Vieira Porto

UTILIZAÇÃO DA ASPARAGINASE NA PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE  
ACRILAMIDA EM CAFÉ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Dr. Otniel Freitas Silva

Co-orientadora: Dra. Leda Maria Fortes Gottschalk

Rio de Janeiro

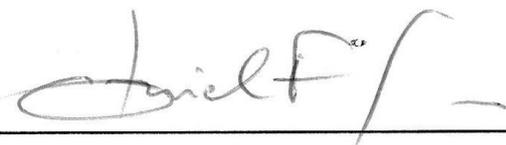
2015

Ana Carolina Vieira Porto

## UTILIZAÇÃO DA ASPARAGINASE NA PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM CAFÉ

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de  
Pós- Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade  
Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em: 13 / 03 / 2015



---

Dr. Otniel Freitas-Silva  
Embrapa Agroindústria de Alimentos



---

Prof. Dr. Edmar Das Mercês Penha  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)



---

Prof. Dr. Alexandre Porte  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)

Dedico este trabalho aos meus pais, Cida e Paulo, por todo apoio, incentivo, amor, carinho, compreensão e pelo investimento na minha educação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda força e perseverança, em todos os momentos.

Aos meus pais, Cida e Paulo.

Aos meus familiares e amigos, por sua compreensão e torcida.

Ao meu namorado, Lucas, por todo amor, incentivo, paciência, força e companheirismo.

Ao meu orientador, Otniel, pela ajuda, oportunidade de aprendizado e ensinamentos proporcionados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, que sempre foram muito solícitos.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos, pela oportunidade de realizar as amostras e parceria.

À todos do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa, por toda sua colaboração e ajuda na realização das análises, em especial minha co-orientadora Leda.

À Novozymes, por ter cedido as enzimas utilizadas no trabalho.

Aos amigos da UNIRIO da turma de 2013.1, pelos bons momentos.

À UNIRIO e à CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora da dissertação: Dr. Otniel Freitas-Silva; Prof. Dr. Edmar Das Mercês Penha; Prof. Dr. Alexandre Porte. E aos suplentes Dra. Alexandra Mara Goulart Nunes Mamede e Dra. Silvia Siag Oigman.

## RESUMO

A presença da acrilamida em alimentos representa riscos à saúde humana. Evidências apontam a asparagina como principal aminoácido precursor no mecanismo de formação da acrilamida e sua formação ocorre durante a reação de Maillard. Sendo assim, para remediar a formação da acrilamida, a enzima asparaginase tem sido utilizada para converter o seu principal precursor, asparagina, em ácido aspártico e amônia. O objetivo do presente estudo foi minimizar a formação de acrilamida em café com a utilização da enzima asparaginase. Os grãos de café utilizados para análise foram: *Coffea arabica* (Arábica) e *C. canephora* (Robusta). Para avaliar a influência do tratamento enzimático foi necessária uma etapa para abertura dos poros dos grãos para que o tratamento enzimático ocorresse na maior parte do grão e não somente na sua superfície. O grão de café verde selecionado foi pré-tratado com vapor para abertura dos poros e submetidos a um vapor fluente (100°C) por 15, 30, 45, e 60 minutos. Os grãos de café com os poros abertos pelo tratamento com vapor foram tratados com a solução de enzima, onde foram avaliadas as condições ótimas da hidrólise enzimática da asparagina incluindo carga de substrato, carga de enzima, tempo, temperatura e pH ideal para a hidrólise. A enzima utilizada foi a Acrylaway CB L. Os grãos de café tratados enzimaticamente foram submetidos a diferentes níveis de carga enzimática (3000, 6000, 9000, 12000 e 15000 ASNU) para verificar os estágios de redução da quantidade de asparagina livre em café verde. Diferentes graus de torra foram estabelecidos e classificados a fim de manter a padronização das amostras. O pré-tratamento com vapor se fez eficaz nas duas amostras porém com tempos diferentes, 30 minutos para o café arábica e 45 minutos para o robusta. Já no tratamento enzimático não houve diferença significativa entre as diferentes cargas enzimáticas utilizadas, portanto, para a otimização do processo a carga enzimática escolhida foi a de 3000 ASNU.

Palavras-chave: Café, asparaginase, acrilamida.

## ABSTRACT

The presence of acrylamide in food is harmful to human health. Asparagine is the main precursor amino acid in the formation mechanism of acrylamide and its formation occurs during the Maillard reaction. Therefore, to remedy the formation of acrylamide, asparaginase enzyme has been used to convert its main precursor, asparagine into aspartic acid, and ammonia. The purpose of this study was to minimize the formation of acrylamide in coffee with the use of asparaginase enzyme. The coffee beans used for analysis were: *Coffea arabica* (Arabica) and *C. canephora* (Robusta). In order to evaluate the influence of enzymatic treatment. The selected green coffee bean was pre-treated with steam to open the pores and submitted to a flowing steam (100 °C) for 15, 30, 45, and 60 minutes. Coffee beans with open pores by steaming were treated with the enzyme solution, to determine the optimum conditions of the enzymatic hydrolysis of the substrate including asparagine load, enzyme load, time, temperature and optimal pH for hydrolysis. The enzyme used was Acrylaway CB L. The coffee beans were enzymatically treated under different load levels of enzyme (3000, 6000, 9000, 12000 and 15000 ASNU) to verify the stages of reducing the amount of free asparagine in green coffee. Different degrees of roasting were established and classified in order to maintain the standardization of the samples. The pre-treatment with steam was effective in both samples but with different times of 30 minutes for arabica to 45 minutes for robusta. In the enzymatic treatment there was no significant difference between the different enzymatic loads used, therefore process optimization to the chosen enzyme load was 3000 ASNU.

Keywords: Coffee, asparaginase, acrylamide.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Instruções do kit enzimático para preparo das reações ____	32
<b>Tabela 2.</b>	Fases da análise cromatográfica_____	39
<b>Tabela 3.</b>	Classificação das torras do café arábica_____	52
<b>Tabela 4.</b>	Classificação das torras do café robusta_____	54

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Níveis de asparagina em café verde <i>versus</i> níveis de acrilamida correspondentes nos cafés torrados. _____	18
<b>Figura 2.</b>	Consumo de alimentos formadores de acrilamida em diferentes populações _____	21
<b>Figura 3.</b>	Contribuição (%) de diferentes alimentos à ingestão de acrilamida no Brasil. _____	23
<b>Figura 4.</b>	Possíveis vias de formação da acrilamida. _____	25
<b>Figura 5.</b>	Fluxograma da metodologia da aplicação do pré-tratamento com vapor _____	30
<b>Figura 6.</b>	Kit enzimático para determinação de amônia _____	33
<b>Figura 7.</b>	Fluxograma da metodologia de aplicação do tratamento enzimático _____	35
<b>Figura 8.</b>	Fluxograma da etapa de extração inicialmente testada (metodologia A) _____	36
<b>Figura 9.</b>	Fluxograma da etapa de extração modificada, testada e implementada no presente estudo (metodologia B – atual)	37
<b>Figura 10.</b>	Gráfico com os primeiros resultados da influência de pré-tratamento no café arábica utilizando a metodologia inicial (metodologia A) _____	42

<b>Figura 11.</b>	Gráfico com os primeiros resultados da influência de pré-tratamento no café robusta utilizando a metodologia inicial (metodologia A) _____	43
<b>Figura 12.</b>	Gráfico de influência do pré-tratamento com vapor no café arábica (metodologia atual) _____	44
<b>Figura 13.</b>	Gráfico de influência do pré-tratamento com vapor no café robusta (metodologia atual) _____	44
<b>Figura 14.</b>	Gráfico de dispersão da porcentagem de asparagina reduzida das duas espécies de café (arábica e robusta) ____	45
<b>Figura 15.</b>	Gráfico da redução de asparagina no café arábica em relação à diferentes cargas enzimáticas _____	47
<b>Figura 16.</b>	Gráfico da redução de asparagina no café robusta em relação à diferentes cargas enzimáticas _____	48
<b>Figura 17.</b>	Gráfico de dispersão da porcentagem de asparagina reduzida nos cafés robusta e arábica com as diferentes cargas enzimáticas _____	49
<b>Figura 18.</b>	Porcentagem de asparagina reduzida com diferentes cargas enzimáticas ((Halford and Biologists, 2013) _____	50
<b>Figura 19.</b>	Graus de torra estabelecidos (clara, média, escura, muito escura I, muito escura II e muito escura III) _____	55

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1 CONSUMO DE CAFÉ NO BRASIL.....	17
3.2 ACRILAMIDA.....	19
3.3 CONSUMO DE ALIMENTOS FORMADORES DE ACRILAMIDA EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	20
3.4 CONSUMO DE ACRILAMIDA.....	22
3.5 TECNOLOGIAS DE TORREFAÇÃO.....	23
3.6 UTILIZAÇÃO DA ENZIMA ASPARAGINASE.....	24
3.7 APLICAÇÃO DA ASPARAGINASE EM CAFÉ.....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 AMOSTRAS DE CAFÉ.....	29
4.2 PRÉ-TRATAMENTO COM VAPOR PARA ABERTURA DOS POROS DOS GRÃOS DE CAFÉ.....	29
4.3 TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM ASPARAGINASE DOS GRÃOS DE CAFÉ.....	31
4.3.1.Determinação da atividade enzimática.....	31
4.3.2. Kit enzimático para determinação de amônia.....	31

4.3.3. Cálculo da atividade enzimática da asparaginase.....	33
4.3.4. Tratamento enzimático dos grãos de café.....	34
4.3.5. Etapa de extração da asparagina livre do grão de café.....	35
4.3.6. Procedimento de derivatização dos aminoácidos.....	37
4.3.7. Análise Cromatográfica.....	39
4.4 SECAGEM, TORREFAÇÃO E MOAGEM DOS GRÃOS DE CAFÉ.....	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
5.1. INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM VAPOR E COMPARATIVO ENTRE AS DUAS METODOLOGIAS APLICADAS.	42
5.2. ANÁLISES DE DIFERENTES CARGAS ENZIMÁTICAS DE ASPARAGINASE.....	47
5.3. RESULTADOS E CLASSIFICAÇÃO DOS DIFERENTES NÍVEIS DE TORRA.....	51
5.3.1. Análise das amostras torradas.....	51
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Após um grande desastre ambiental, decorrente da construção de túneis na Suécia, os trabalhadores envolvidos na construção foram expostos à agentes selantes contendo acrilamida. Suas análises sanguíneas mostraram a presença de bioindicadores de exposição quando comparados com grupo controle. Sendo assim, cientistas começaram a estudá-la e classificá-la como substância tóxica (ALVES *et al*, 2010; NERI, 2004).

Sequencialmente, surgiram hipóteses para tentar identificar a origem da acrilamida, que, por eliminação das fontes de exposição já conhecidas, como as poliacrilamidas e o aquecimento de matéria orgânica, acabaram apontando para o alimento como fonte potencial principal (ARISSETO & TOLEDO, 2008; FELSOT, 2002; REYNOLDS, 2002)

Embora os dados disponíveis sejam limitados na análise de risco da acrilamida em induzir tumores na população humana, ela foi classificada como um provável carcinógeno humano (IARC, 1994). A presença da acrilamida em alimentos pode representar riscos à saúde humana, incluindo o consumo de café. Seu potencial toxicológico em alimentos está relacionado não somente à presença de seus precursores, asparagina e açúcares redutores, mas também com as concentrações desses compostos na matéria-prima, que podem variar significativamente entre diferentes espécies, as práticas de cultivo e o processamento (BORÉM *et al*, 2009).

Sendo assim, a acrilamida tem sido considerada substância potencialmente cancerígena e neurotóxica, formada quando alimentos ricos em carboidratos são fritos, assados ou torrados acima de 120°C (ARISSETO & TOLEDO, 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu o limite de consumo diário desta substância em 1 µg/kg peso corpóreo/dia de acrilamida ou 60 µg, assumindo-se um peso corpóreo de 60 kg (WHO, 2005; SNFA, 2002).

Evidências apontam a asparagina como principal aminoácido envolvido na reação de Maillard, como um dos precursores chave no mecanismo de formação da acrilamida (NERI, 2004). Por isso, recentemente para remediar a formação da acrilamida, foi utilizada a enzima asparaginase, que converte o

precursor asparagina em ácido aspártico e amônia (PEDRESCHI, KAACK e GRANBY, 2008; PEDRESCHI *et al*, 2011). Pesquisa realizada em 2013 por Halford & Biologists, usando também uma enzima comercial (Acrylaway®), relatou sobre o efeito de asparaginase na redução de formação de acrilamida em café e esta redução foi de 70-80%.

As asparaginases comerciais de algumas companhias se tornaram disponíveis por volta de 2008, e muitas aplicações focaram em batatas (FDE, 2011). A aplicação da enzima asparaginase em batatas fritas mostrou ser muito promissora, a acrilamida contida nesse alimento foi reduzida em aproximadamente 90% sem alteração nas propriedades sensoriais do produto (MEDEIROS *et al*, 2011). O efeito da asparaginase sobre a mitigação de acrilamida em biscoitos foi examinada por Anese *et al.*, (2011) que utilizou a asparaginase comercial Acrylaway em 15 grupos diferentes, com diferentes fatores.

O café é uma das bebidas mais importantes no mundo devido ao seu sabor e aroma. Como seu consumo é elevado, torna-se também um interessante objeto de pesquisa pelas mudanças químicas durante o processamento dos grãos, que podem resultar em variações na quantidade e na qualidade dos precursores do sabor e aroma. Sua composição química de destaque são a cafeína e o ácido clorogênico, que influenciam a saúde humana (DIAS *et al*, 2009).

Alguns estudos têm determinado o teor de acrilamida em café e o seu conteúdo parece depender não só de sua espécie botânica, bem como do tipo de processamento a qual este produto é submetido. Uma comparação entre os cafés Robusta e Arábica, que são as espécies de maior impacto econômico, mostrou que o primeiro produz um nível mais elevado de acrilamida. Isto é provavelmente devido ao maior teor de asparagina presente nos grãos verdes de café Robusta (MEDEIROS *et al*, 2011; LANTZ *et al.*, 2006). A formação da acrilamida ocorre rapidamente com o início do processo de torrefação, e diminui um pouco depois, quando este atinge um nível máximo, provavelmente devido às perdas físicas e químicas (ALVES *et al*, 2010).

O teor de acrilamida em grãos de café torrados é extremamente variável e os níveis normalmente relatados na literatura estão dentro da faixa de 0,027-0,609 mg de acrilamida por kg de café (FDA, 2006; ALVES *et al.*, 2010). Já o teor de acrilamida no produto final em diferentes marcas de café com cafeína ou descafeinado também varia amplamente, de 0,5-4,21 µg por 300 mL de café (PEDRECHI *et al.*, 2011; ANDRZEJEWSKI *et al.*, 2004).

A pesquisa científica tem investigado as vias de formação da acrilamida, e como resultado, algumas medidas orientadoras foram desenvolvidas, com as diretrizes para os produtores e processadores no que diz respeito a identificação e maneiras para diminuir a quantidade de acrilamida nos seus produtos (EFSA, 2011).

Desde 2002, a indústria de alimentos em todo o mundo tem colaborado com os cientistas, a fim de reduzir os níveis de acrilamida em alimentos ricos em carboidratos quando submetidos à temperaturas acima de 120°C. A formação de acrilamida é uma parte da reação de Maillard que também gera aroma, sabor e cor num alimento, por isso, é difícil encontrar um método de redução de acrilamida eficaz que não afete as propriedades sensoriais dos alimentos. Existem diferentes estratégias visando à redução da acrilamida em alimentos. Em primeiro lugar, a utilização de matérias com baixo nível de precursores da formação de acrilamida pode ser utilizada para reduzir a sua quantidade no produto final. Paralelamente as condições do processo podem ser modificadas, de modo a diminuir a quantidade de formação de acrilamida. Por fim, a intervenção pós - processo pode ser utilizada para reduzir a acrilamida (PEDRESCHI *et al.*, 2014).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

Reduzir a formação de acrilamida em café pela aplicação da enzima asparaginase no processamento dos grãos verdes antes da torra.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar e quantificar a asparagina nos grãos verdes das duas espécies de café estudadas (*Arábica e Robusta*);
- Desenvolver um método de aplicação da enzima asparaginase para identificação da asparagina livre em café através da análise por CLAE;
- Diminuir o teor da asparagina com a aplicação da asparaginase pela metodologia desenvolvida;
- Determinar e classificar diferentes graus de torra das duas espécies de café estudadas (claro, médio, escuro, muito escuro I, II e III);

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. CONSUMO DE CAFÉ NO BRASIL

O café é uma bebida de grande popularidade, com aroma e sabor característico, consumida mundialmente. Diversas pesquisas têm demonstrado que os constituintes do café provocam inúmeras respostas farmacológicas e celulares (NAIDU *et al*, 2008).

O café natural produzido no Brasil apresenta ao longo da colheita frutos em diferentes estágios de maturação, e a colheita do café verde causa prejuízo quanto ao tipo e a qualidade da bebida e como consequência, interfere no valor comercial do produto. A homogeneização do café somente será conseguida com a adoção de técnicas adequadas na pós-colheita (DIAS *et al*, 2009).

As duas espécies de café de importância comercial são *Coffea arabica* (Arábica) e *Coffea canephora* (Robusta). O Arábica corresponde a cerca de 64%, enquanto o Robusta é responsável por 35% da produção de café do mundo. Ambas as espécies são quimicamente distintas e caracterizadas por diferentes níveis de minerais, cafeína e substâncias voláteis (RUBAYIZA & MEURENS, 2005).

Entre os aminoácidos presentes nos grãos de café, a asparagina é o principal precursor da acrilamida, substância potencialmente prejudicial à saúde. Os teores de asparagina tornam-se relevantes quando se trabalha com frutos verdes, pois sua concentração é maior nos grãos dos frutos imaturos do cafeeiro. DIAS *et al* (2009) demonstraram que o descascamento dos frutos verdes possibilita uma redução nos níveis de asparagina, aminoácido essencial para a formação de acrilamida no café torrado.

A concentração de asparagina livre em grãos de café verde fica dentro de uma faixa muito estreita, tipicamente 0,2 - 1,0 g/kg, em média, níveis ligeiramente mais elevados em grãos Robusta (STADLER *et al*, 2004; LANTZ *et al*, 2006).

Uma análise da quantidade de asparagina em cafés verdes e de concentração de acrilamida correspondente após a torrefação mostrou apenas uma correlação positiva (Figura 1) (LANTZ *et al*, 2006).

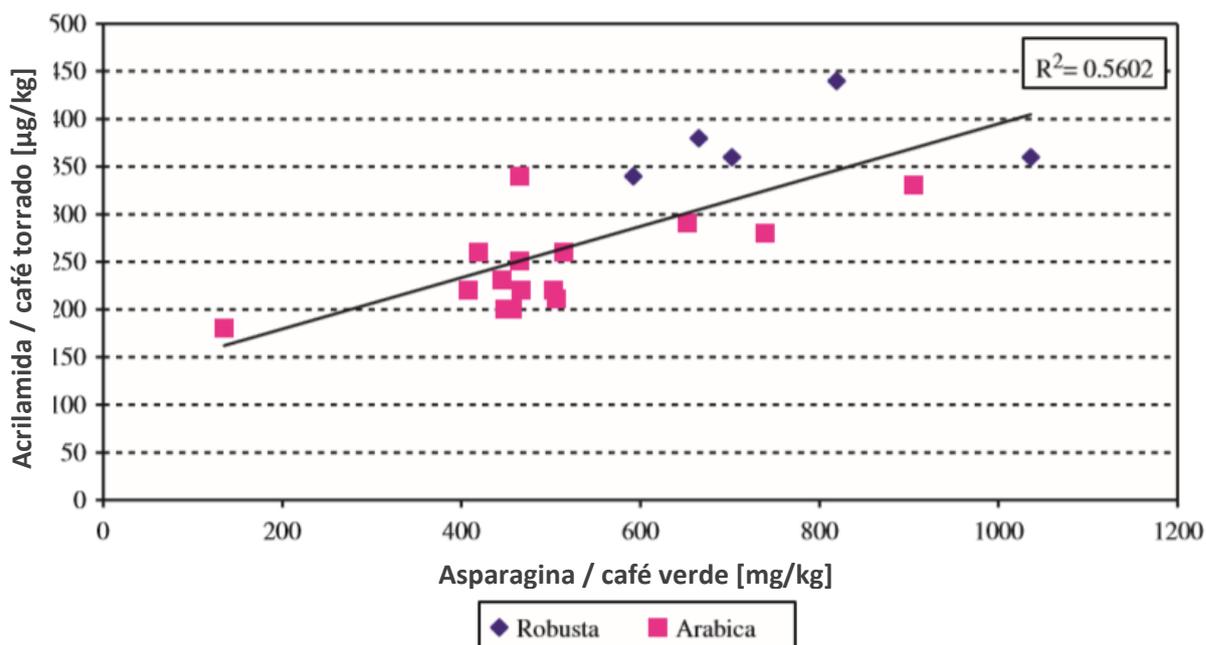


Figura 1: Níveis de asparagina em café verde *versus* níveis de acrilamida correspondentes nos cafés torrados.  
FONTE: LANTZ *et al*, 2006.

A composição química do café torrado é complexa e ainda não completamente esclarecida. Os componentes são criados, equilibrados, ou alterados de uma forma que deveria aumentar o sabor, acidez e corpo do café durante e depois a torrefação. A temperatura de torrefação determina os tipos específicos de reações químicas que ocorrem no café. Além das características desejadas, as alterações indesejáveis, tais como a formação de acrilamida deve também ser considerada neste processo (SENYUVA & GOKMEN, 2005).

A quantidade de acrilamida encontrada no café torrado é relativamente baixa em relação ao potencial de formação resultante da presença abundante de asparagina e de açúcares redutores. No café, a acrilamida é formada em altas concentrações durante os primeiros minutos de torra, resultando em níveis de 7.000 ng/g. O aumento do tempo de torração leva, porém à degradação da acrilamida (DIAS *et al*, 2009).

Um fator que pode contribuir para níveis relativamente elevados de acrilamida é o número de grãos defeituosos utilizados na produção. Grãos de café defeituosos, principalmente os grãos imaturos são caracterizados por valores significativamente mais elevados de asparagina livre quando comparados com grãos maduros (GUENTHER *et al*, 2007).

O consumo está estimado para crescer 3,5% ao ano nos próximos 10 anos. A Associação Brasileira da Indústria de Café – ABIC (2011) verificou que o consumo aumentou em 4,0% em 2001, e vem crescendo sistematicamente desde 2003. O consumo de café no país tem aumentado e a estimativa da ABIC (2012) para 2011 é de 4,88 kg/ habitante/ano de café torrado, sendo o maior já registrado no Brasil (MAPA, 2012).

### 3.2. ACRILAMIDA

Um grupo de pesquisadores suecos em abril de 2002 reportou a presença de acrilamida em alimentos ricos em carboidratos, quando estes eram assados, fritos ou torrados. Destes alimentos, destacaram-se os cereais, as batatas e o café como possivelmente os mais contaminados por acrilamida, correspondendo as maiores fontes de ingestão (ARISSETO & TOLEDO, 2008; TARAKE *et al*, 2002).

Em trabalhos posteriores ficou evidenciado que os produtos que mais contribuem para a exposição dos consumidores a acrilamida são: batatas fritas (16 - 30%); batata chips (6 - 46%); café (13 - 39%); produtos de panificação e biscoitos doces (10 - 20%); pães e torradas (10 - 30%) em função ao tipo de processamento utilizado (DIAS *et al*, 2009).

A acrilamida é uma molécula reativa alfa, beta-carbonil insaturada, comumente obtida a partir da hidratação da acrilonitrila e vem sendo produzida comercialmente pela indústria desde 1950 pois, é uma substância química usada na produção da poliacrilamida e também utilizada na produção de colas, papel, cosméticos e na construção de fundações de represas e túneis (NERI, 2004). Em alguns alimentos ela é formada quando estes são submetidos às

altas temperaturas e seus níveis parecem variar com o tempo e o modo de aquecimento, mostrando existir uma correlação com o escurecimento do produto (DIAS *et al*, 2009).

Em 2005, o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) avaliou dados de ingestão de acrilamida em 17 países. A ingestão de acrilamida foi estimada em 0,3 a 2,0 µg/kg de peso corpóreo por dia (µg/kg pc/dia) para consumidores médios e entre 0,6 a 5,1 µg/kg pc/dia para grandes consumidores (percentil 90 a 99). Os alimentos que mais contribuíram para a ingestão de acrilamida foram batata frita, batata chips, café, biscoito e pão (FAO/WHO, 2005).

No caso do café, as reações de formação de acrilamida são dominantes no início do ciclo de torrefação e depois diminui abruptamente no fim do ciclo, devido às altas taxas de eliminação (GUENTHER *et al*, 2007).

### 3.3. CONSUMO DE ALIMENTOS FORMADORES DE ACRILAMIDA EM DIFERENTES POPULAÇÕES

Há grandes alterações dos níveis de consumo de alimentos formadores de acrilamida entre populações de diferentes países além da ampla variação que acontece nos grupos populacionais específicos (crianças, adolescentes, adultos, homens e mulheres - Figura 2). Essa grande variação observada nos níveis totais de acrilamida da dieta em diferentes categorias de alimentos deve estimular o desenvolvimento de novas abordagens para reduzir o conteúdo de acrilamida nos alimentos ricos nesta substância. Com isso, o foco deve estar na redução dos níveis de acrilamida em alimentos predominantemente fontes desta substância para algumas populações onde são mais amplamente consumidos. (FRIEDMAN & LEVIN, 2008).

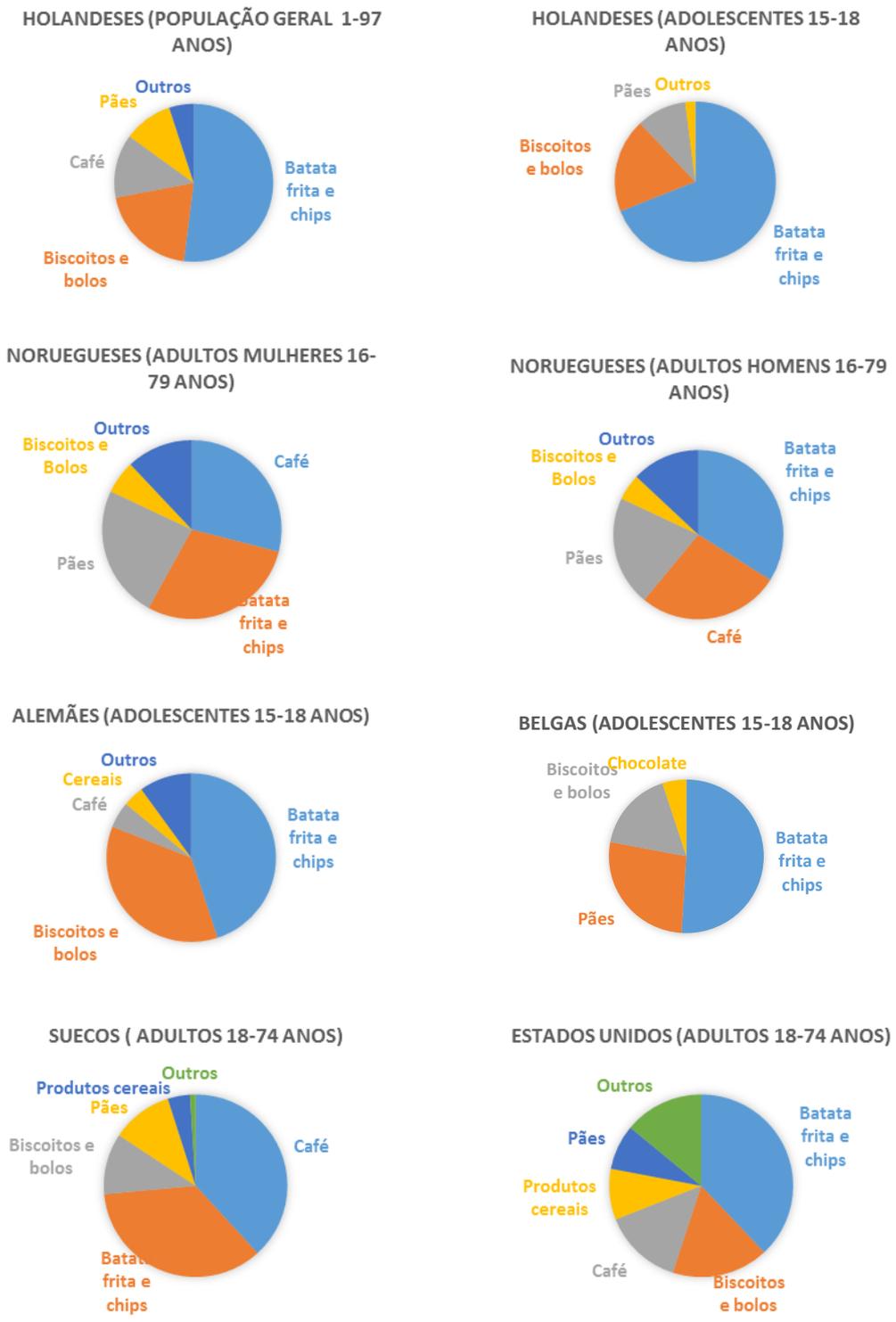


Figura 2: Consumo de alimentos formadores de acrilamida em diferentes populações. FONTE: FRIEDMAN & LEVIN, 2008

A contribuição do café ao teor total de acrilamida na dieta varia muito demograficamente, entre 13% para Holanda, 14% nos Estados Unidos, 29% para as norueguesas adultas e 39% para os suecos adultos. Estes resultados indicam que para algumas populações a quantidade de acrilamida presente no café deve ser considerada importante (FRIEDMAN & LEVIN, 2008).

#### 3.4. CONSUMO DE ACRILAMIDA

O elevado consumo de café em vários países o torna uma potencial fonte significativa de exposição diária à acrilamida. Devido ao uso de grãos de café torrados para o preparo da bebida, a probabilidade de níveis significativos de acrilamida estarem presentes é elevada (SENYUVA & GOKMEN, 2005).

O café tem sido relatado por contribuir substancialmente para a ingestão dietética total de acrilamida, especialmente nos países nórdicos. O café torrado e moído não é consumido como tal, mas preparado como bebida pela adição de água quente e filtração subsequente. Assim, o cálculo do teor de acrilamida por xícara é um termo de suma importância sobre o nível de exposição. Por exemplo, considerando um teor médio de acrilamida de 250 µg/Kg no pó de café e uma mistura de 50 g/L (5% em café preparado), assim cerca de 6 – 8 xícaras irá resultar numa absorção de acrilamida de 12,5 µg (considerando a extração total de acrilamida do pó) (GUENTHER *et al*,2007).

ARISSETO & TOLEDO (2008) realizaram um estudo sobre a estimativa da ingestão de acrilamida no Brasil com base nas médias regionais de consumo alimentar. Neste estudo ficou evidenciado que os valores de ingestão mais baixos foram encontrados nas regiões centro-oeste (0,09 µg/kg pc/dia), nordeste (0,11 µg/kg pc/dia) e norte (0,12 µg/kg pc/dia), enquanto que a mais alta ingestão foi observada na região sul (0,20 µg/kg pc/dia). O valor mais próximo da média nacional foi estimado para a região sudeste (0,15 µg/kg pc/dia)

A Figura 3 ilustra os alimentos que mais contribuíram para a exposição dos brasileiros à acrilamida.

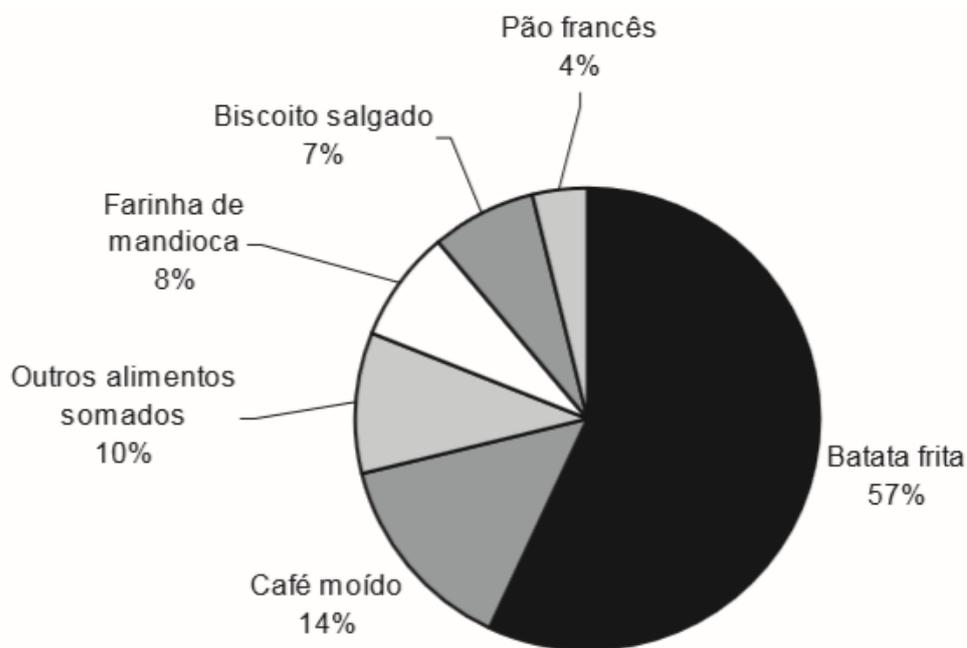


Figura 3: Contribuição (%) de diferentes alimentos à ingestão de acrilamida no Brasil.  
 FONTE: ARISSETO & TOLEDO, 2008

Como observado, a batata frita foi a mais importante fonte de exposição ao contaminante, seguida pelo café moído, farinha de mandioca, biscoito salgado e pão francês. Assim, pode-se observar a importância do presente estudo. Outros alimentos somados contribuíram com menos de 10% do total. As diferenças observadas em relação à ingestão de acrilamida entre as regiões do Brasil podem ser atribuídas às diferenças nos hábitos alimentares (ARISSETO & TOLEDO, 2008).

### 3.5 TECNOLOGIAS DE TORREFAÇÃO DO CAFÉ

No início da torrefação do café, a formação de acrilamida aumenta rapidamente, depois de ter atingido um máximo na primeira metade do ciclo total, o nível de acrilamida diminui conforme a continuação da torrefação. Os níveis de acrilamida do produto final estão em apenas 20-30% dos níveis

máximos. Sendo assim a concentração final, depende do grau do café torrado e do tempo de torrefação (ARISSETO & TOLEDO, 2006).

A torrefação mais escura, em geral, e o prolongamento do tempo de torra usando temperaturas mais baixas de, tendem a reduzir o nível de acrilamida, mas ambos os parâmetros devem ser fixados em intervalos estreitos para atingir o perfil de sabor alvo (ARISSETO & TOLEDO, 2006; ARISSETO & TOLEDO, 2008).

Diferente da maioria das outras categorias de alimentos, a concentração de acrilamida em café diminui com o aumento da potência térmica de torrefação mais escura. A hipótese é que em temperaturas mais elevadas, tal como é aplicado durante a torrefação do café, ocorram reações que conduzem à perda de acrilamida para o fim do ciclo de torrefação (FARAH *et al*, 2006).

Estas reações não são ainda totalmente compreendidas, mas a hipótese é apoiada por estudos em sistemas modelo que mostram um aumento e uma posterior diminuição da temperatura durante a formação de acrilamida, explicada pela reação de polimerização (FARAH *et al*, 2006; ARISSETO & TOLEDO, 2006).

### 3.6. UTILIZAÇÃO DA ENZIMA ASPARAGINASE

A principal via que leva a acrilamida nos alimentos é através da reação de Maillard. Marcadores com isótopos utilizados em diferentes estudos tem demonstrado que o aminoácido asparagina é a chave para dar origem à acrilamida (STADLER, 2002).

É geralmente aceito que a principal rota para a formação de acrilamida em café – como na maioria dos outros alimentos – é a reação de Maillard precoce, iniciada pela condensação de asparagina e carboidratos redutores, como frutose ou glicose. No entanto, os grãos de café são sujeitos a temperaturas relativamente mais altas do que outros alimentos, onde são torrados na faixa de 220 - 250°C. Dessa maneira, mais vias além da

condensação da asparagina/açúcar, podem ser esperadas para fornecer acrilamida através da reação de Maillard. Uma visão geral das possíveis vias está representada na Figura 4 (GUENTHER *et al*,2007).

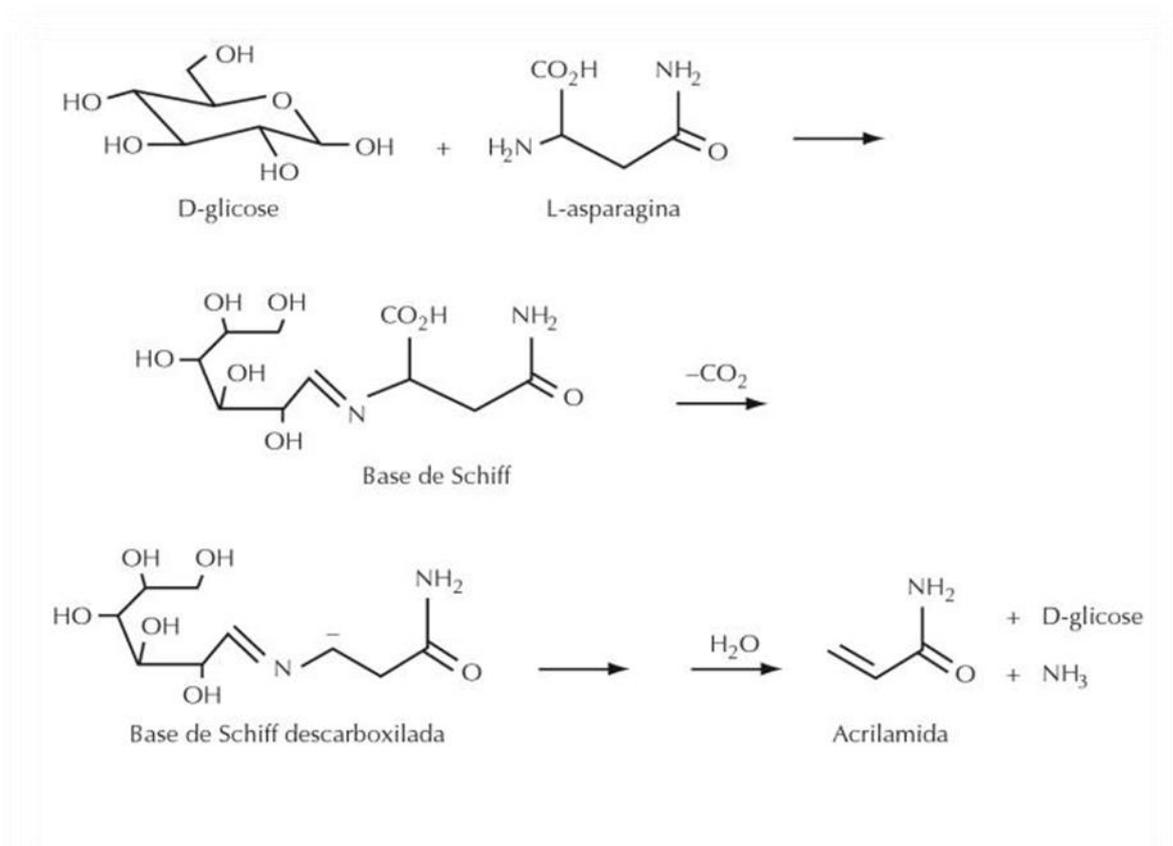


Figura 4: Possíveis via de formação da acrilamida.

FONTE: GUENTHER *et al*, 2007.

A asparaginase é uma enzima que converte a asparagina em ácido aspártico. Estima-se que em certos processamentos de alimentos (produtos de panificação, por exemplo), esta enzima no futuro pode ser uma eficaz ferramenta para diminuir substancialmente os níveis de acrilamida (CIAA, 2006). É difícil de avaliar o grau de redução que a enzima vai proporcionar uma vez que sua atividade é dependente do binômio tempo/temperatura de incubação (GUENTHER *et al*,2007).

A enzima asparaginase, recebeu o consentimento geral de segurança na sua utilização pelo governo dos Estados Unidos, e tem sido feita avaliações

favoráveis da enzima pela FAO / WHO Expert Committee Joint em Aditivos Alimentares (JEFCA, 2007). Também foi feita uma avaliação favorável como aditivo alimentar pela comissão conjunta FAO / WHO Expert (JEFCA, 2007). Atualmente é utilizada em vários países, incluindo Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia, China, Rússia, México e vários países europeus. Uma vez que diferentes quantidades de asparaginase podem ser utilizadas em diferentes tipos de alimentos, não há um padrão unificado da quantidade máxima desta enzima. No entanto, como a enzima irá ser completamente inativada no processo de aquecimento subsequente, sua utilização em alimentos é considerada segura.

Foram identificadas novas fontes de produção de asparaginase para redução de acrilamida. Tuncel (2010) extraiu asparaginase a partir de uma fonte vegetal. Eles germinaram a farinha de ervilha para aumentar a atividade enzimática e remover o sabor de feijão cru. A partir da extração da asparaginase, foi adicionada à farinha de trigo e preparados três tipos diferentes de pães: pão branco, pão integral e de farelo de pão branco integral. O pão era cozido a 220°C por 22-25 min. A redução de acrilamida no pão branco foi relativamente baixa em comparação com os outros. No entanto, o nível de acrilamida foi reduzido em 57% e 68% em pão integral e no farelo de pão integral, respectivamente. Embora o teste de painel sensorial mostrou diferença detectável no produto final, a asparaginase adicionada ao produto ainda tem uma elevada aceitação pelo consumidor (TUNCEL *et al.*, 2010).

O efeito da asparaginase sobre a mitigação de acrilamida em biscoitos foi examinada por Anese *et al.*, (2011) que utilizou a asparaginase comercial Acrylaway em 15 grupos diferentes, com diferentes fatores. Ao analisar os resultados de cada grupo, um sistema modelo foi configurado com sucesso sendo útil para processos industriais, uma vez que demonstra um método que pudesse avaliar o efeito da enzima e equilibrar com a preocupação orçamento. A pesquisa também foi relacionada com o efeito da formulação sobre a capacidade de asparaginase necessária para minimizar a formação de acrilamida. Por exemplo, o desenvolvimento de acrilamida era no mínimo em

concentrações intermédias de asparaginase e a adição desta enzima, não afetava significativamente a cor do produto final (ANESE *et al.*, 2011).

A última pesquisa foi realizada em 2013 por Hendriksen usando a enzima comercial Acrylaway®. Esta pesquisa incluiu batata e produtos alimentares à base de trigo e também a primeira experiência relatando sobre o efeito de asparaginase na redução da formação de acrilamida em café. Para o produto à base de trigo, a eficiência de redução atingiu 95%. Além dos produtos de batata e de trigo, café foi testado nesta pesquisa e redução de 70-80% foi alcançada (HENDRIKSEN, 2013).

### 3.7. APLICAÇÃO DA ASPARAGINASE EM CAFÉ

A pesquisa realizada em 2013 por Hendriksen usando a enzima comercial Acrylaway® conteve no primeiro experimento relato sobre o efeito de asparaginase na redução de formação de acrilamida em café e esta redução foi de 70-80%. Eles usam verde 150g que foram cozinhados por 45 minutos a 100°C. Os grãos foram misturados com 103.5mL de água aquecida (60°C) contendo Acrylaway® L. As amostras foram incubadas a 60°C durante 60 min com agitação. Após 45-60 minutos, toda a água tinha sido absorvida pelos grãos. Os grãos verdes foram tratados com HCL (0,1 M) adicionado para inativar a enzima e para extrair a asparagina. Então, estes grãos de café foram secos e torrados (HENDRIKSEN, 2013).

A asparaginase pode ser aplicada em condições semelhantes onde, o vapor é usado para abrir os poros dos grãos de café verde assegurando um contato suficiente da enzima com asparagina nos grãos. O experimento em escala de laboratório indicou que uma dose baixa (2000-6000 ASNU) aplicada nos grãos de café verde, alcançaria uma redução de 55% - 74%. Em conclusão, os resultados mostraram a possibilidade de aplicação de enzima sobre o café.

Resultados preliminares de estudos de laboratório / plantas piloto, mostraram uma redução significativa de acrilamida no café verde. Isto resultou em níveis inferiores de 10-45% de acrilamida após a torrefação com magnitude dependendo da torra / condições de mistura e, quando comparado com um café não tratado que tenha sido torrado nas mesmas condições (PARZEFALL, 2008).

A faixa relatada para reduções potenciais de acrilamida é medida diretamente após a sua torra. A diferença segundo PARZEFALL (2008) parece diminuir (5-35%) no período de tempo até que o café é tipicamente consumido. Este fato é possivelmente devido ao efeito de diminuição de acrilamida durante a vida de armazenamento / prateleira.

O sabor do café é significativamente e negativamente influenciado pelo processo de tratamento enzimático. Em particular, os grãos de café Arábica, que são conhecidos por seu apreciado aroma nas bebidas finais, são severamente afetados, muitas vezes levando a perfis sem gosto (PARZEFALL, 2008; STADLER, 2005).

## 4. MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1. AMOSTRAS DE CAFÉ

Os grãos de café utilizados para análise foram: *Coffea arabica* (Arábica) e *Coffea canephora* (Robusta). Todas as amostras foram adquiridas de regiões produtoras dos estados de Minas Gerais (*C. arabica*) e do Espírito Santo (*C. canephora*), nos respectivos municípios Machado e Santa Tereza. Tais amostras foram transportadas e armazenadas nos laboratórios de Diagnostico Molecular e Micologia e de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

### 4.2. PRÉ-TRATAMENTO COM VAPOR PARA ABERTURA DOS POROS DOS GRÃOS DE CAFÉ

Para avaliar a influência do tratamento enzimático foi necessária uma etapa para abertura dos poros dos grãos para que o tratamento enzimático ocorresse na maior parte do grão e não somente na superfície.

Aproximadamente, 10g do grão verde selecionado de café (por ensaio) foram separados em becker e submetidos ao vapor fluente (100°C) durante 15, 30, 45 e 60 minutos acondicionados em uma peneira para garantir contato direto com o vapor.

Na Figura 5 pode-se observar o diagrama de aplicação do pré-tratamento com vapor.

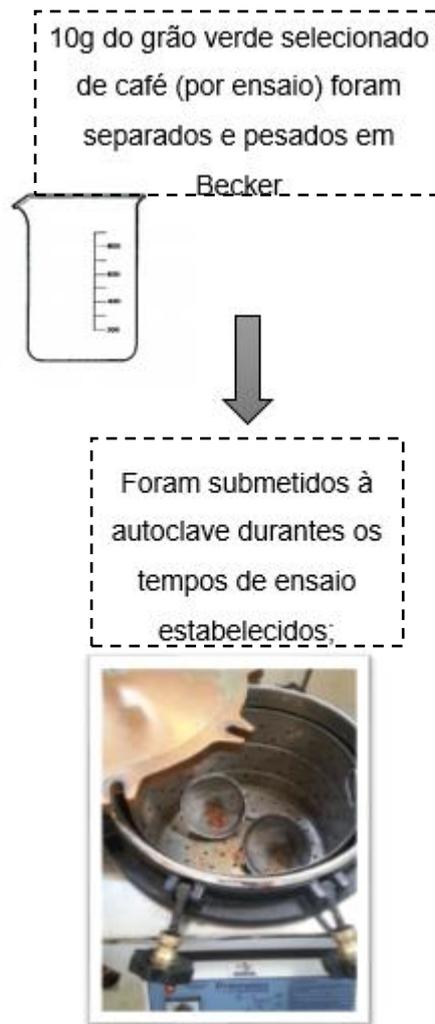


Figura 5: Metodologia da aplicação do pré-tratamento com vapor.

Foram utilizados 10 ensaios sendo estes, 5 para o café Robusta e 5 para o café Arábica, onde: 10g (por ensaio) para os tempos de 0 (controle), 15, 30, 45 e 60 minutos de exposição dos grãos ao vapor fluente.

### 4.3. TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM ASPARAGINASE DOS GRÃOS DE CAFÉ

Os grãos de café com os poros abertos pelo tratamento com vapor foram hidrolisados com a solução de enzima asparaginase (Acrylaway CB L). Nesta etapa foi avaliada a carga de enzima (asparaginase), nas condições de hidrólise enzimática mencionadas em trabalhos anteriores (Temperatura de 60°C e agitação de 200rpm por 1 hora). A enzima utilizada foi a Acrylaway CB L, gentilmente cedida pela empresa Novozymes (parceira dentro do atual projeto). Em seguida, o grão úmido de café foi seco em estufa por aproximadamente 2h para depois ser torrado.

#### 4.3.1..Determinação da atividade enzimática

Foi preparada uma solução de asparagina 0,25 M, onde foi pesado 0,33 g de asparagina padrão em um balão de 10 mL e o mesmo completo com solução tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7,0). Em um Becker foi adicionado 1 mL do substrato preparado (solução de asparagina), 3mL da solução tampão de potássio 20 mM (pH 7,0) e 1 mL da enzima asparaginase (Acrylaway CB L) diluída 100 vezes. O substrato (asparagina) é convertido em ácido aspártico e amônia e a amônia resultante é quantificada com o auxílio de um Kit enzimático da ROCHE/BOEHRINGER.

Em paralelo, um branco foi feito, onde a enzima foi substituída por água destilada. Esta reação durou 30 minutos, sob agitação, e logo após foi retirado 0,100 mL para a junção com os reagentes provenientes do kit enzimático.

#### 4.3.2. Kit enzimático para determinação de amônia

A amônia produzida reagiu com o alfa-cetoglutarato na presença da enzima glutamato desidrogenase, A enzima é NADH dependente e catalisa a aminação do alfa-cetoglutarato com consumo de quantidades estequiométricas

de NADH (que absorve em 340 nm), formando ácido glutâmico e NAD<sup>+</sup> (que não absorve em 340 nm). A reação é acompanhada pela medida da absorvância a 340 nm que detecta o desaparecimento do NADH. Assim, a quantidade de NADH oxidado na reação está estequiometricamente relacionada com a quantidade de amônia presente.

O kit enzimático continha os seguintes reagentes:

- Frasco 1 = 60mL de solução tampão
- Frasco 2 = 50 pastilhas de NADH
- Frasco 3 = 1,2mL de solução de glutamato de desidrogenase

**Tabela 1:** Instruções do kit enzimático para preparo das reações

	Branco (Kit)	Amostra	Branco 2
Mistura 2*	1000 mL	1000 mL	1000 mL
Amostra	-	0,100 mL	0,100 mL
Água destilada	2000 mL	1,900 mL	1,900 mL

- Mistura 2 = 1 pastilha de NADH dissolvido em 1 mL da solução tampão (do kit).

Após 5 minutos de reação, foi realizada a primeira leitura em espectrofotômetro, a seguir, adicionou 0,020mL da solução 3 (do kit) e esperou-se 20 minutos para reação se completar, e então se fez a segunda leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 340nm. A Figura 6 mostra a fotografia do Kit enzimático utilizado.



Figura 6: Kit enzimático para determinação de amônia.

#### 4.3.3. Cálculo da atividade enzimática da asparaginase

De acordo com a equação geral para calcular a concentração:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

V = Volume final

v = Volume da amostra

MW = Peso molecular

d = Caminho da luz

$\epsilon$  = Extensão do coeficiente do NADH = 340 nm = 6.3

$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{amostra}} - (A_1 - A_2)_{\text{branco}}$

c = 3500 ASNU de asparaginase.

#### **4.3.4. Tratamento enzimático dos grãos de café**

Durante processo de aplicação da enzima, 10 g de café submetidos ou não ao pré-tratamento com vapor, foram transferidos para Erlenmeyer de 250 mL. Com a amostra na balança zerada, foram adicionados 1,47 mL quantidade de enzima asparaginase diluída 100 vezes e o peso completado com água deionizada, utilizada por ter o mesmo pH considerado ótimo para a enzima, até atingir 6 g (enzima + água deionizada). Nesta condição a carga enzimática era de 3500 ASNU/g de café seco e a quantidade de água de 60% (para que toda a água fosse absorvida depois de 1 hora de hidrólise).

As amostras foram colocadas em shaker à 60°C por tempo de 1 hora e em seguida esses grãos são depositados em placas de Petri e levados para estufa à 80°C por tempo de aproximadamente 2 horas, até a secagem total dos grãos.

Após o tratamento enzimático, com os grãos já secos, estes foram triturados e moídos com um Mix (PHILIPS WALITA™) e peneirados em peneira fina simples para manter a granulometria padronizada.

A figura 7 representa o diagrama da metodologia aplicada para a realização do tratamento enzimático.

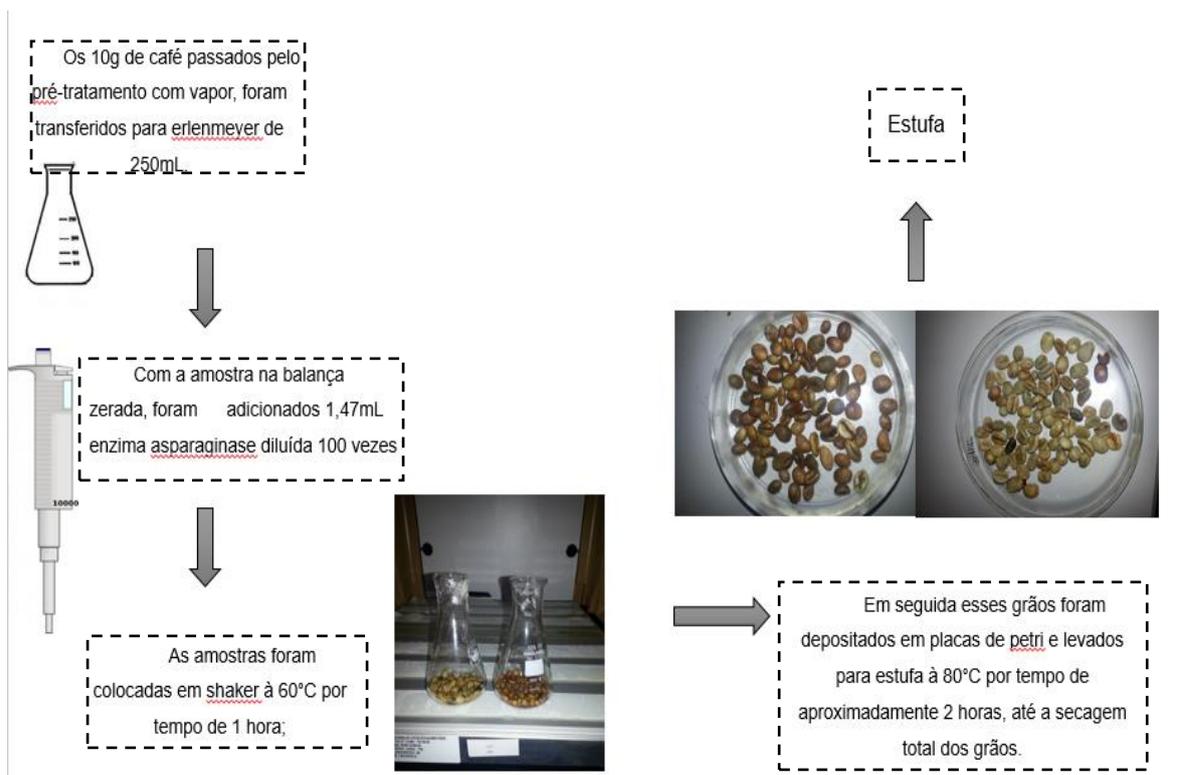


Figura 7: Diagrama da metodologia de aplicação do tratamento enzimático.

#### 4.3.5. Etapa de extração da asparagina livre do grão de café

Para o estabelecimento de uma metodologia para identificação da asparagina livre por cromatografia líquida, duas metodologias foram avaliadas:

- Metodologia A, onde os resultados não foram consistentes.
- Metodologia B, metodologia atual, aplicada no estudo.

A parte das duas metodologias que se diferem no processo de extração da asparagina livre das amostras de café e do procedimento de hidrólise ácida dos aminoácidos.

Na metodologia A (inicialmente testada), 5 g do café moído foram pesados diretamente em tubos de Falcon de 50 mL e adicionados 40 mL HCL 0,1 M; Os tubos ficaram em agitador rotatório durante 30 minutos para posterior filtragem em papel filtro. As amostras então eram congeladas e enviadas à cromatografia líquida.

A figura 8 apresenta o diagrama da etapa de extração inicialmente testada (metodologia A).

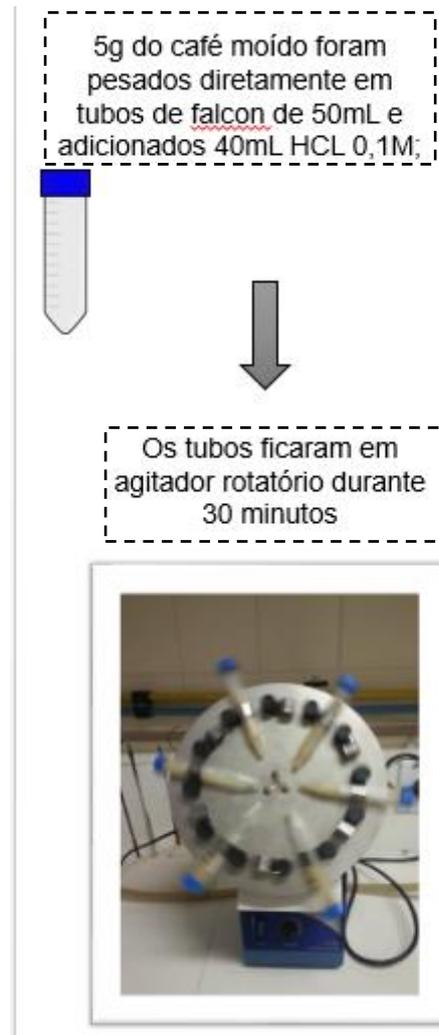


Figura 8: Diagrama da etapa de extração inicialmente testada (metodologia A).

Já na metodologia atual (metodologia B), foram pesados 1g do café moído em balão de 25 mL, e sem avolumar foi acrescentado HCL 0,1 M; Com isso os balões foram para o ultrassom por 20 minutos e depois foram avolumados. A solução contida nos balões foram transferidas para tubo de Falcon 50 mL e centrifugados por 10 minutos/4500 rpm;

Logo após a centrifugação, a solução foi transferida para tubos de ensaio e foram passadas em vortex. Estas foram microfiltradas em microfiltros 0,22 $\mu$ m, as amostras microfiltradas foram passadas novamente em vortex e transferidos 1 mL para tubo Eppendorf.

Estas amostras não foram congeladas e enviadas imediatamente para análise por CLAE.

A figura 9 apresenta o diagrama da etapa de extração modificada, testada e implementada no presente estudo (metodologia B – atual).

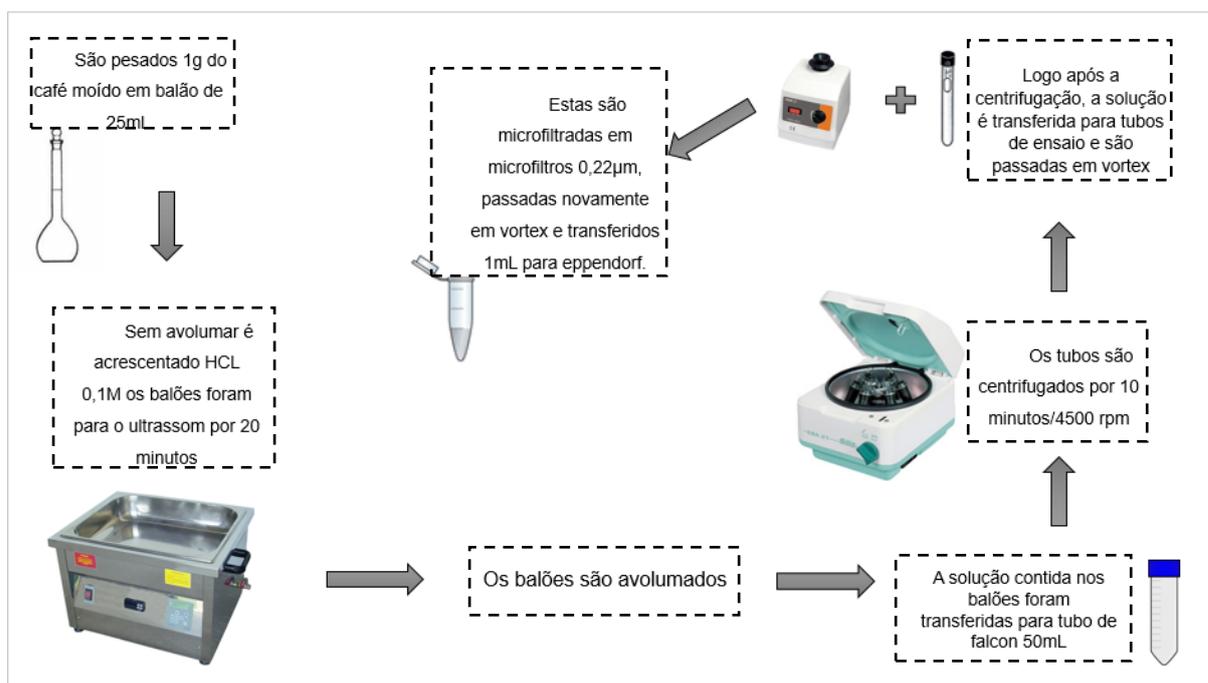


Figura 9: Diagrama da etapa de extração modificada, testada e implementada no presente estudo (metodologia B – atual).

#### 4.3.6. Procedimento de derivatização dos aminoácidos

Seguindo o protocolo de extração e identificação nas amostras durante a primeira metodologia (A) o preparo de calibração seguiu:

- Transferiu uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  de uma ampola padrão de aminoácidos para um vial, e transferiu para o mesmo vial uma alíquota de 960  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q.
- A reação de derivatização foi feita em seguida.

Já, para a metodologia B (atual), o preparo do padrão de calibração foi:

- Foram pesados 2 mg de padrão de ácido aspártico e asparagina em um mesmo balão de 50 mL e completou com HCL 0,1 M;
- Foi realizado em seguida a derivatização;

#### **Reação de derivatização:**

- A estufa foi pré aquecida à 55°C;
- Retirou-se uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do padrão de calibração para um vial;
- Pipetou-se 70  $\mu\text{L}$  do tampão borato (AccQ-Fluor Borate Buffer) para o mesmo vial e misturou-se vigorosamente em vórtex por 5 segundos;
- Ainda para o mesmo vial, foi transferido uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de AQC (AccQ-Fluor Reagent Powder). Agitou-se em vórtex durante 10 segundos e aguardou 1 minuto para o término da reação;
- Todo o volume da reação foi transferido para redutor de volume e levado para estufa à 55 $\pm$  1°C por 10 minutos;
- Cada 5  $\mu\text{L}$  de volume injetado contém 50 pmol de cada aminoácido derivatizado exceto cistina, que equivale à 25 pmol).

#### 4.3.7. Análise Cromatográfica

O gradiente utilizado foi definido nos métodos no software **Empower™** conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2:** Fases da análise cromatográfica

Tempo (minutos)	% Fase móvel A	% Fase móvel B	% Fase móvel C
Inicial	100	0	0
0,5	99	1	0
18,0	95	5	0
19,0	91	9	0
29,5	83	17	0
33,0	0	60	40
36,0	100	0	0
45,0	100	0	0

Fase móvel A: solução Acc-Q Tag® (1:10); fase móvel B: acetonitrila; fase móvel C: água.

Antes de iniciar as injeções deve-se condicionar a coluna cromatográfica com o método de análise até estabilização da linha base e temperatura do forno. Somente injetar em cromatógrafo líquido com filtro de linha, previamente estabilizado e calibrado. Fazer uma injeção por preparo de amostra.

Condições cromatográficas:

- Coluna Cromatográfica: AccQ.Tag® 3,9mm x 150mm (Waters, EUA);
- Coluna Cromatográfica alternativa: BDS Hypersil C18 100 mm x 4,6 mm tamanho de partícula: 2,4 µ ( Thermo Scientific );
- Pré-coluna: mesma fase da coluna (opcional)
- Temperatura da coluna: 37°C
- Temperatura do injetor: 15°C
- Eluição: Gradiente
- Fase Móvel A: Solução AccQ Tag® (Waters, EUA) 1:10 com água Milli-Q

- Fase móvel B: Acetonitrila
- Fase móvel C: água Milli-Q recém coletada
- Fluxo: 1,0 mL/min
- Detetor Fluorescência:  $\lambda_{exc}=250\text{nm}$  e  $\lambda_{em}=395\text{nm}$
- Volume padrão de injeção: 5mL
- Tempo de corrida: 45 minutos
- Tempo de Delay: 10 minutos

#### 4.4 SECAGEM, TORREFAÇÃO E MOAGEM DOS GRÃOS DE CAFÉ

Os grãos de café não tratados e tratados enzimaticamente foram submetidos a diferentes níveis de torra para alcançar a cor de grão claro, médio, escuro e muito escuro, além do branco, que será o café verde. Estas torras ficaram estabelecidas como: Torras clara (12 minutos à 230°C); Torra média (14 minutos à 240°C); Torra escura (15 minutos à 245°C); Torra muito escura I (16 minutos à 250°C); Torra muito escura II (18 minutos à 250°C) e torra muito escura III (23 minutos à 250°C). As torras foram classificadas de acordo com a Escala Agtron. Os tempos de torra e a temperatura foram fixados de forma a produzir os níveis de coloração de grão descritos.

Para o café torrado e moído foram utilizadas, então, três amostras de café verde. Cada uma destas amostras foi dividida em sete partes, das quais uma será o tratamento controle (ou branco analítico) e as demais (sem e com tratamento enzimático) sofrerão os tratamentos de acordo com os níveis de torra (claro, médio, escuro e muito escuro I, II e III).

Foram realizadas três repetições para os tratamentos descritos anteriormente, as quais foram submetidas à todas as análises propostas. Os resultados obtidos foram avaliados utilizando-se programa estatístico e segundo os testes pertinentes para o conjunto de dados e correlações.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM VAPOR E COMPARATIVO ENTRE AS DUAS METODOLOGIAS APLICADAS

A partir dos primeiros resultados obtivos pela aplicação da metodologia A, foi verificado uma alternância entre os resultados das amostras analisadas e com isso percebeu-se a heterogenidade do café e a necessidade da modificação da metodologia de extração aplicada para que transformassemos essas amostras mais homogeneamente possíveis e límpidas para diminuir assim as grandes diferenças encontradas com a leitura em HPLC. A seguir, as figuras 11 e 12 demonstram esses resultados obtidos com a metodologia A.

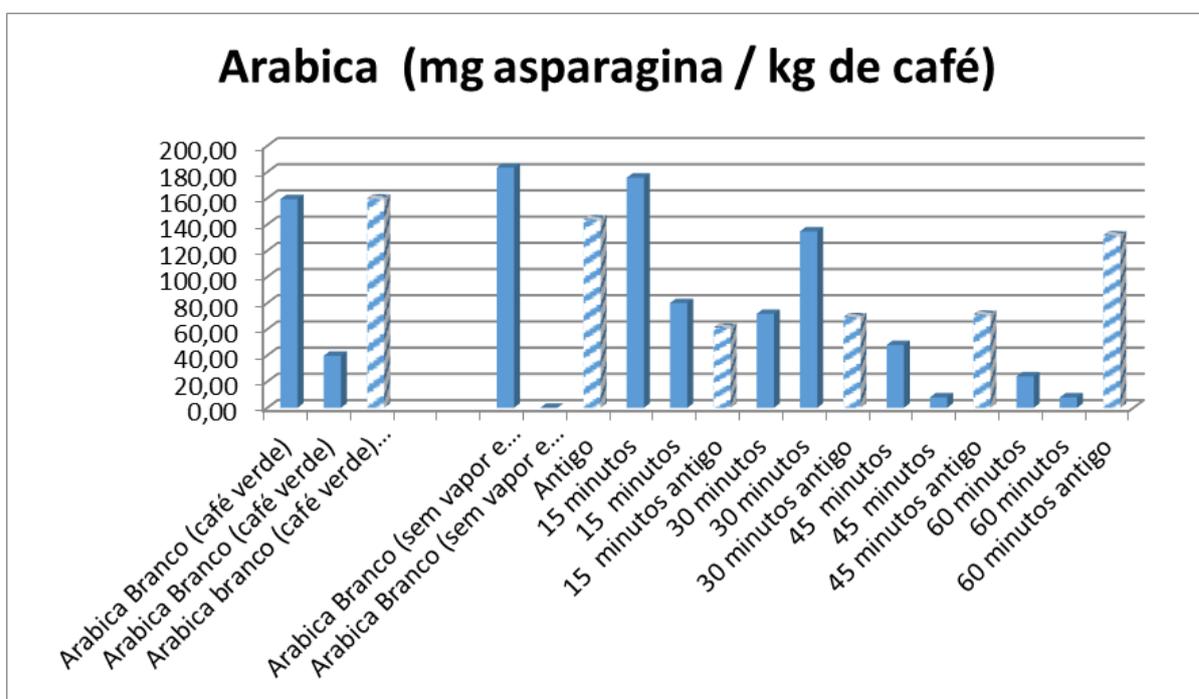


Figura 10: Gráfico com os primeiros resultados da influência de pré-tratamento no café arábica utilizando a metodologia inicial (metodologia A).

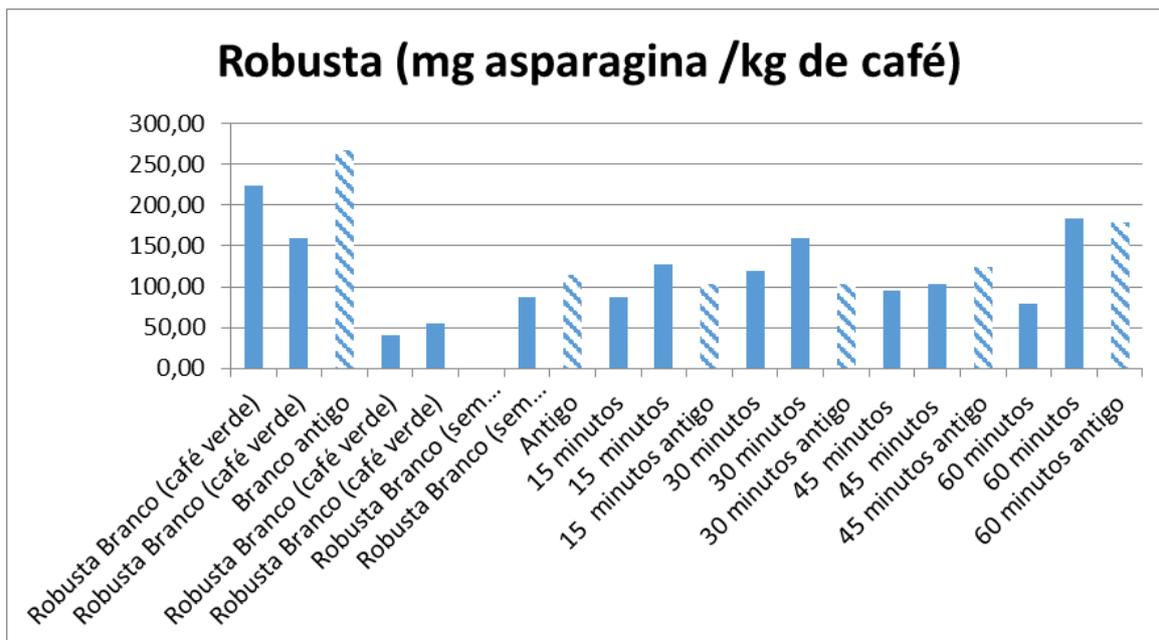


Figura 11: Gráfico com os primeiros resultados da influência de pré-tratamento no café robusta utilizando a metodologia inicial (metodologia A).

Observa-se com as figuras 11 e 12 que a partir da extração com a metodologia A, utilizada inicialmente, para o café arábica o tempo de 15 minutos se fazia mais eficaz e para o café robusta não havia uma diferença significativamente entre os diferentes tempos, indicando assim não ser necessário para esta espécie de café o pré-tratamento com vapor para a abertura dos poros dos grãos.

A partir da inconsistência dos resultados obtidos quando mesmas amostras eram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência, houve a necessidade da adaptação e modificação da metodologia de extração destas amostras para sua posterior análise. Então foi desenvolvida a metodologia B (atual) aplicada no estudo e comprovando sua eficiência na identificação e quantificação da asparagina quando estas amostras eram analisadas. As figuras 13 e 14 demonstram a influência do pré-tratamento com vapor com a metodologia atual sendo aplicada.

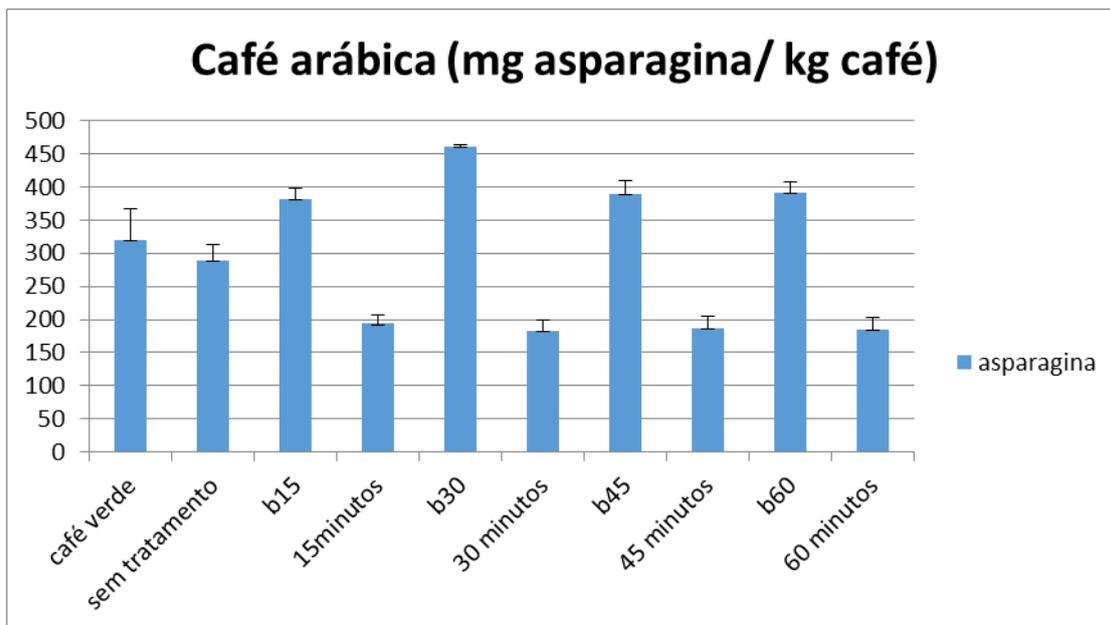


Figura 12: Gráfico de influência do pré-tratamento com vapor no café arábica (metodologia B).

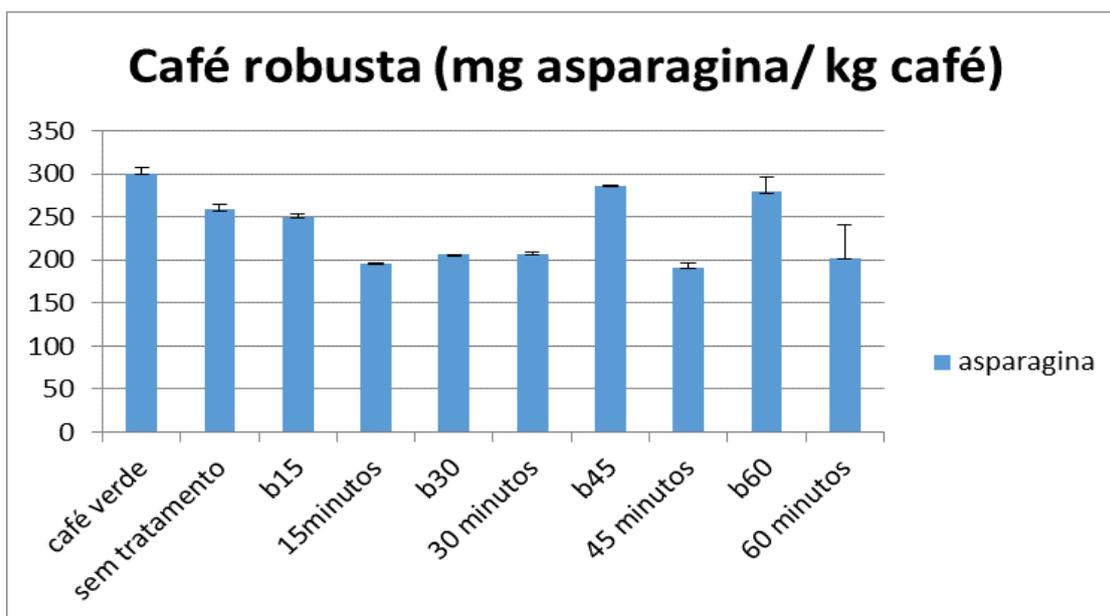


Figura 13: Gráfico de influência do pré-tratamento com vapor no café robusta (metodologia B).

A partir das análises com a implementação da nova metodologia os resultados foram acertados, ou seja, as repetições foram próximas e o valor de desvio padrão a partir da média foi considerado dentro dos padrões.

Pode-se observar que para o grão do café arábica o tempo de pré-tratamento que se fez validado foi o de 30 minutos onde houve a redução de aproximadamente 60% da quantidade de asparagina quando comparado com a amostra sem pré-tratamento (controle).

Já no grão do café robusta o melhor tempo de pré-tratamento foi o de 45 minutos onde houve a redução de aproximadamente 35% da quantidade de asparagina no grão de café. Podemos observar melhor esses dados na figura 14, onde o gráfico de dispersão faz a comparação entre a percentagem de asparagina reduzida nas duas espécies (arábica e robusta).

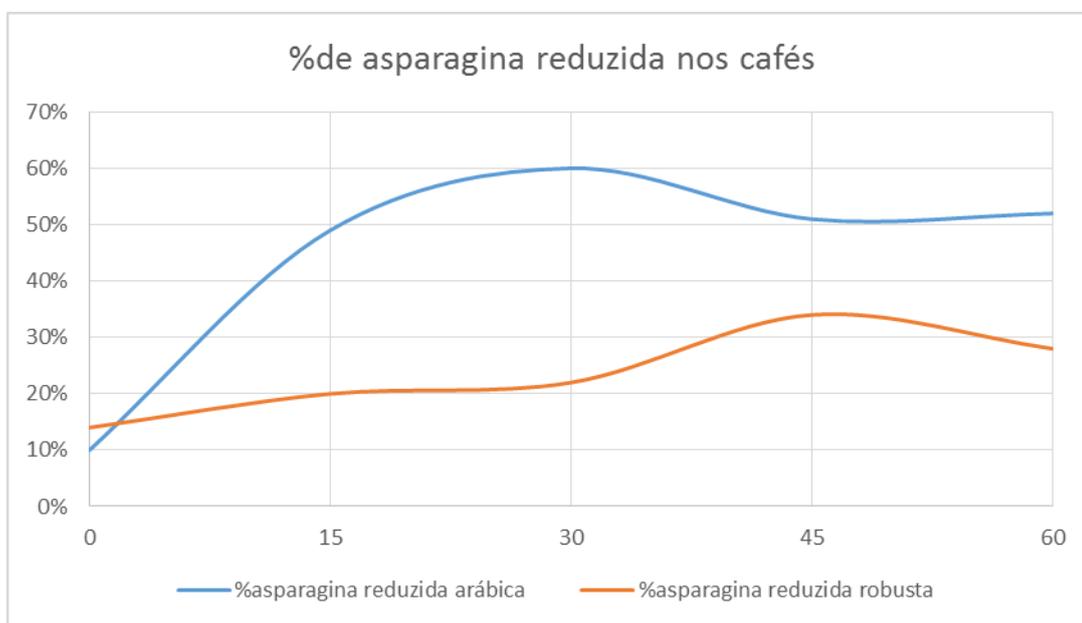


Figura 14: Gráfico de dispersão da percentagem de asparagina reduzida das duas espécies de café (arábica e robusta).

Normalmente, os grãos de café verde passam por um pré-tratamento com vapor para diminuir seu teor de cafeína. O processo de descafeinação é normalmente realizado por um sistema de vapor de água ou partição por

solvente. A asparaginase pode ser aplicada em condições semelhantes, o pré-tratamento com vapor é utilizado para abrir os poros dos grãos de café verde e assegurar um contato maior e suficiente da enzima com asparagina presente nos grãos de café (HENDRIKSEN, 2013).

O processo de pré-tratamento com vapor foi implementado antes do tratamento enzimático para garantir o contato suficiente entre enzima e a asparagina dos grãos. Teoricamente, o grão de café verde tem que passar pelo vapor para permitir que a asparagina livre saia do poro. O grão de café verde tem uma estrutura muito “apertada” em que menos de 7% do seu volume de poro tem um diâmetro de 10 nm mais ou menos. O diâmetro das enzimas é geralmente cerca de 5-10 nm assim como são as grandes partículas de proteína. Desse modo, apenas uma parte limitada do grão é acessível a uma quantidade relativamente grande da enzima. Assim, para alterar a estrutura interna original do grão de café verde e difundir a asparagina fora do grão de café se faz necessário o pré-tratamento com vapor (WHITEHURST and VAN OORT, 2009).

Nos estudos realizados nesta área específica (de aplicação asparaginase no café), Hendriksen (2013) conseguiu alcançar bons resultados (entre 30% -60 % na redução de asparagina para o café robusta e arábica, respectivamente).

Portanto, os resultados encontrados nas análises da influência do pré-tratamento com vapor nos grãos de cafés com a implementação da nova metodologia de extração foram satisfatórios.

## 5.2. ANÁLISES DE DIFERENTES CARGAS ENZIMÁTICAS DE ASPARAGINASE

A partir da comprovação de eficácia e determinação da metodologia atual, sendo a metodologia B, esta foi implementada como usual no presente estudo.

Foram realizados experimentos da melhor carga enzimática a ser utilizada em cada espécie de café estudadas (arábica e robusta) para posterior análise e verificação de qual carga causa a maior redução de asparagina nos grãos de café.

As cargas enzimáticas escolhidas foram 3000 ASNU, 6000 ASNU, 9000 ASNU, 12000 ASNU e 15000 ASNU. Em paralelo foi realizado um branco (grupo controle) onde as amostras não receberam a adição da enzima.

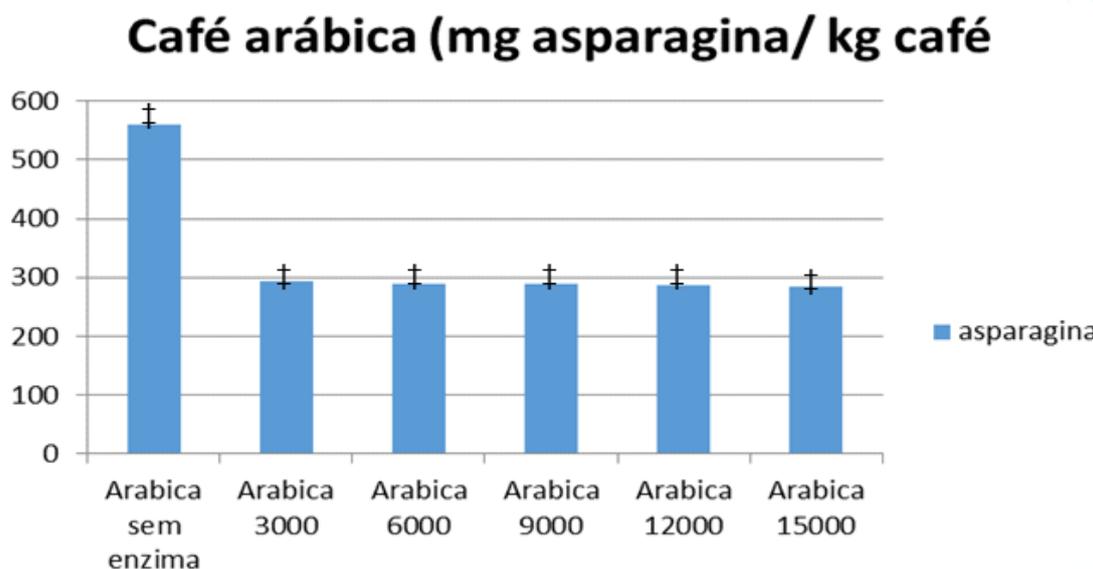


Figura 15: Gráfico da redução de asparagina no café arábica em relação à diferentes cargas enzimáticas.

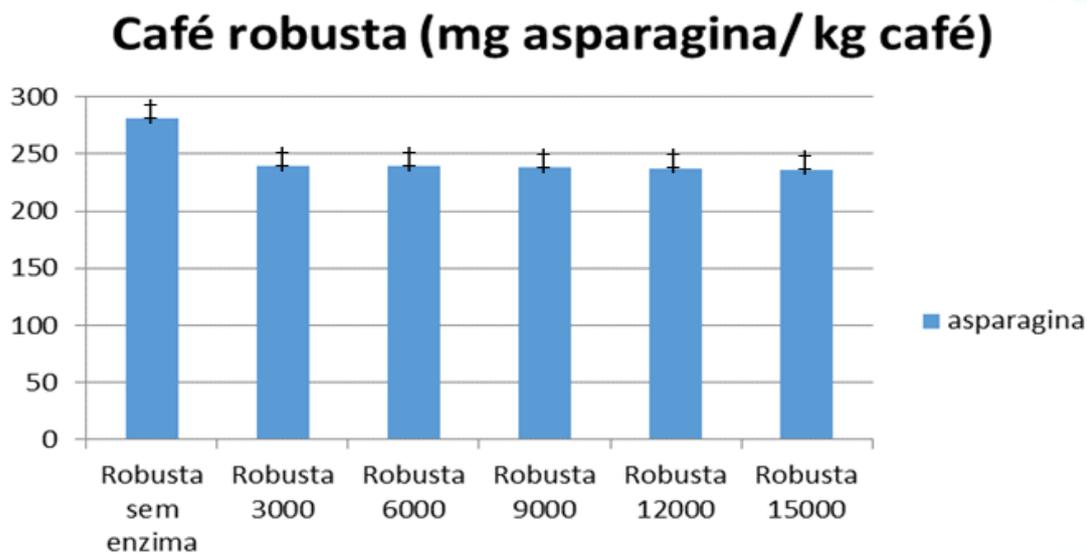


Figura 16: Gráfico da redução de asparagina no café robusta em relação à diferentes cargas enzimáticas.

Observou-se que a carga enzimática que demonstrou maior eficiência na redução da asparagina tanto no café arábica quanto no café robusta foi a de 3000 ASNU, pois a partir desta carga enzimática observou-se uma igualmente redução por meio das outras cargas enzimáticas testadas além da estagnação observada a partir da carga escolhida como mais eficiente porém sem demonstrar uma diferença significativa entre elas.

A carga de 3000 ASNU se mostra mais eficaz, portanto, pois além da sua redução no nível de asparagina, apesar de observado nas outras cargas, não há diferenças significativas entre elas. Então visando a otimização do processo e também a diminuição da utilização dos recursos, a carga de 3000 ASNU se faz escolhida como a melhor para o tratamento enzimático de ambas as espécies de café.

Halford and Biologists (2013), também demonstraram os níveis de acrilamida e de asparagina de acordo com a utilização de diferentes cargas enzimáticas. A maior redução encontrada por eles foi a carga enzimática de 2000 ASNU e a partir da carga de aproximadamente 4000 ASNU aconteceu a estagnação da redução tanto de asparagina quanto de acrilamida.

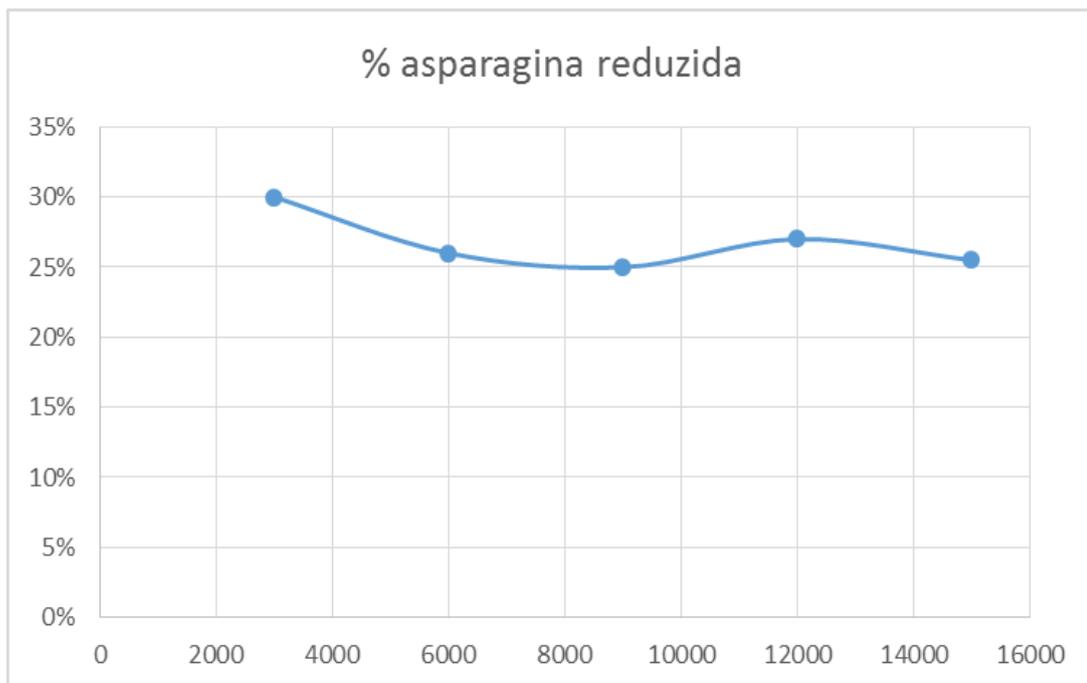


Figura 17: Gráfico de dispersão da porcentagem de asparagina reduzida nos cafés robusta e arábica com as diferentes cargas enzimáticas.

Os resultados demonstraram que a carga enzimática 3000 ASNU reduziu em aproximadamente 30% do nível de asparagina dos cafés, e também houve a redução de aproximadamente este valor para as outras cargas enzimáticas avaliadas, porém com estagnação.

Comparando estes valores com a figura 18, se combinarmos os resultados em conjunto e traçá-los em um gráfico de dispersão, podemos considerar que a redução de asparagina não tem uma relação linear com o aumento da quantidade da enzima asparaginase.

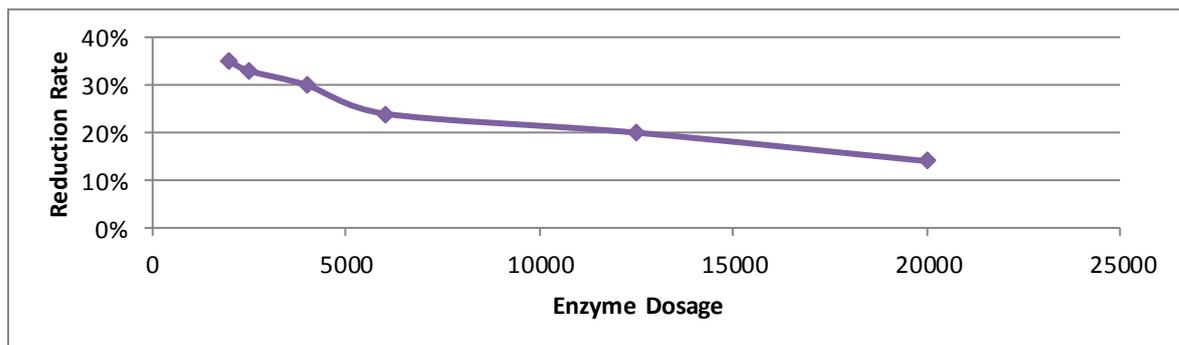


Figura 18: Porcentagem de asparagina reduzida com diferentes cargas enzimáticas ((Halford and Biologists, 2013).

A redução vai atingir uma condição ótima em torno de 3000 ASNU nos resultados encontrados e de aproximadamente 6000 ASNU nos resultados encontrados por Harold (2013) quando comparados.

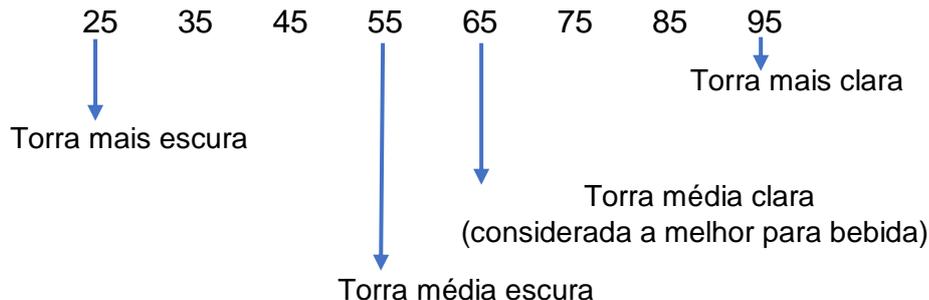
Mesmo a concentração de asparaginase sendo aumentada, apenas parte de asparagina é reduzida, indicando assim que uma quantidade ótima da enzima deve ser utilizada a fim de visar a otimização do processo.

### 5.3. RESULTADOS E CLASSIFICAÇÃO DOS DIFERENTES NÍVEIS DE TORRA

A Classificação dos diferentes graus de torra pela ABIC (Associação Brasileira de Indústria de Café) ocorre através da chamada Escala Agtron. Nesta escala, a variação dos graus de torra ocorre do número 25 ao número 95.

O número 25 dentro da classificação da Escala Agtron representa a torra mais escura, variando estas entre o número 35 e 45. O número 55 já entra na escala de classificação das torras médias, sendo esta considerada a torra média escura. A variação das torras médias continua com o número 65 (torra média clara) considerada a melhor torra para a bebida de café. Entrando nas torras claras, as classificações são numeradas com o número 85 e 95, sendo este a torra mais clara considerada pela Escala Agtron.

Escala Agtron (variação do nº 25 até o nº 95 em grau de torra)



#### 5.3.1. Análise das amostras torradas

Os cafés Arábica e Robusta foram torrados de acordo com as especificações contidas no manual do equipamento de torra utilizado. Após as torras, estas foram comparadas e classificadas de acordo com a Escala Agtron. Os cafés foram torrados com os graus de torra estabelecidos: Torra Clara: 12 minutos à 230°C; Torra Média: 14 minutos à 240°C; Torra Escura: 15 minutos à

245°C; Torra Muito Escura I: 16 minutos à 250°C; Torra Muito Escura II: 18 minutos à 250°C e Torra Muito Escura III: 23 minutos à 250°C.

Para o café Arábica, a torra clara ficou fora da classificação da escala Agtron por ser mais clara que o número 95 (a mais clara na escala); A torra média, foi classificada na escala Agtron sendo a número 95 (considerada torra mais clara da escala de classificação); A torra escura, foi classificada na escala Agtron como número 65 (considerada torra média clara – a melhor torra para bebida); A torra muito escura I, foi classificada na escala agtron como a número 55 (considerada torra média – um padrão de torra média); A torra muito escura II, foi classificada na escala Agtron como a número 45 (considerada torra moderadamente escura – é a torra máxima estabelecida/exigida pela legislação); E a torra muito escura III, ficou fora da classificação da escala Agtron por ser mais escura que o número 25 (o mais escuro na escala) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Classificação das torras do café arábica

<b>Café Arábica</b>	
<b>Amostras</b>	<b>Classificação na Escala Agtron</b>
Torra Clara (12 minutos à 230°C)	Fora da classificação (mais claro que o n° 95)
Torra Média (14 minutos à 240°C)	N° 95
Torra Escura (15 minutos à 245°C)	N° 65
Torra Muito Escura I (16 minutos à 250°C)	N° 55
Torra Muito Escura II (18 minutos à 250°C)	N° 45
Torra Muito Escura III (23 minutos à 250°C)	Fora da classificação (mais escuro que o n° 25)

Foi observado com os resultados então, que para o café arábica, duas das torras determinadas ficaram de fora da classificação da escala Agtron, por serem consideradas mais claras que o mínimo e mais escuras que o máximo, torra clara e muito escura III, respectivamente.

Porém as torras, média, escura, muito escura I e II, encontram-se dentro dos padrões de classificação estabelecidos pela escala Agtron e a torra escura sendo considerada a ideal para torra de café.

Já para o café Robusta, a torra clara, está fora da classificação da escala agtron por ser mais clara que o número 95 (a mais clara na escala); A torra média, está fora da classificação da escala agtron por ser mais clara que o número 95 (a mais clara na escala); A torra escura, está fora da classificação da escala agtron por ser mais clara que o número 95 (a mais clara na escala); A torra muito escura I, foi classificada na escala agtron como a número 85 (considerada torra clara); A torra muito escura II, foi classificada na escala agtron como a número 55 (considerada torra média - um padrão de torra média); E a torra muito escura III, foi classificada na escala agtron como a número 25 (considerada o valor mais alto da escala agtron – torra muito escura) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Classificação das torras do café robusta

<b>Café Robusta</b>	
<b>Amostras</b>	<b>Classificação na Escala Agtron</b>
Torra Clara (12 minutos à 230°C)	Fora da classificação (mais claro que o n° 95)
Torra Média (14 minutos à 240°C)	Fora da classificação (mais claro que o n° 95)
Torra Escura (15 minutos à 245°C)	Fora da classificação (mais claro que o n° 95)
Torra Muito Escura I (16 minutos à 250°C)	N° 85
Torra Muito Escura II (18 minutos à 250°C)	N° 55
Torra Muito Escura III (23 minutos à 250°C)	N° 25

Foi observado com os resultados, que para o café robusta, a três primeiras torras determinadas, torra clara, torra média e torra escura ficaram de fora da classificação da escala Agtron, por serem consideradas mais claras que o mínimo.

Porém as torras escuras, I, II, e III, encontram-se dentro dos padrões de classificação estabelecidos pela escala Agtron.



Figura 19: Graus de torra estabelecidos (clara, média, escura, muito escura I, muito escura II e muito escura III).

Os graus de torra pré-estabelecidos no presente estudo e que foram avaliados e classificados segundo a escala Agtron determinada pela ABIC (Associação Brasileira da Indústria de café) seguiram torras já determinadas que acompanharam o equipamento utilizado (torrefador).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram a efetividade da enzima asparaginase (Acrylaway CB L) na redução da asparagina livre nos grãos verdes de café, tanto da espécie arábica quanto da espécie robusta.

Os tempos de pré-tratamentos com vapor testados mostraram efetividade para as duas espécies de café, porém, com tempos diferenciados (30 minutos para o café arábica e 45 minutos para o café robusta), e isso pode ser atribuído a diferente composição química encontrada nas duas espécies.

Já que a asparagina é considerada a principal precursora na formação de acrilamida durante a reação de Maillard, conseqüentemente com a sua redução pela utilização da enzima, também trará a redução da formação da acrilamida quando estes grãos forem torrados. Porém estudos devem ser realizados a partir dos cafés torrados para comprovação da efetividade da enzima quanto a redução da formação de acrilamida nos grãos de café quando estes forem torrados.

Como perspectivas de trabalhos futuros, é importante estudar a redução de acrilamida por cromatografia líquida/gasosa nos diferentes níveis de torra e o perfil sensorial de cafés tratados enzimaticamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALVES, R.C.; SOARES, C.; CASAL, S.; FERNANDES, J.O.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA, P.P. Acrylamide in espresso coffee: influence of species, roast degree and brew length. **Food Chemistry**. V.119, n.03, p.929 – 934. 2010.

ANDRZEJEWSKI, D.; ROACH, J.A.; GAY, M.L.; MUSSER, S.M. Analysis of coffee for the presence of acrylamide. **Food Chemistry**. V.52, n.05, p.1996 – 2002. 2004.

ANESE, M., QUARTA, B., PELOUX, L. & CALLIGARIS, S. (2011). Effect of formulation on the capacity of l-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. **Food Research International**, V.44, p. 2837-2842/

ARISSETO, M.A.P.; TOLEDO, C. Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia**. V.1, n.21, p.9 -14. 2008.

ARISSETO, M.A.P.; TOLEDO, C.F. Acrilamida em Alimentos: Uma Revisão. **Food Technology**. V.9, n.2, p.123-134. 2006.

BORÉM, F.M.; DIAS, E.C.; GUERREIRO, M.C.; PEREIRA, R.G.; OLIVEIRA, P.D.; NOBRE, G.W.; NEVES, J.B. Perfil de aminoácidos nos frutos verdes do cafeeiro processados por via seca e via úmida. **VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 2009.

CIAA; European Food and Drink Federation. **Acrylamide Toolbox Document**. September 2006. Disponível em: <http://www.CIAA.be/documents/positions/The%20CIAA%20Acrylamide%20Toolbox.pdf> (acesso em agosto de 2013).

DIAS, E.D.; BORÉM, F.M.; PEREIRA, R.G.; SOARES, C.; CUNHA, S.; FERNANDES, J.O. Determinação dos níveis de acrilamida em cafés verdes obtidos por diferentes processamentos. **VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 2009.

EFSA Journal. Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and exposure assessment. 2011. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2133.pdf>. (acesso em janeiro de 2013).

FARAH, A.; MONTEIRO, M.C.; CALADO, V.; FRANCA, A.S.; TRUGO, L.C. Correlation Between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**. V.98, n.07, p.373-380. 2006.

FDA. Survey data on acrylamide in food: individual food products. FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition; Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acryldata.html#u1004>, 2006. (acesso em 20 de março de 2013).

FDE (FOOD DRINK EUROPE). Acrylamide Toolbox Document, September 2011. Disponível em: [http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications\\_documents/Toolboxfinal260911.pdf](http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/Toolboxfinal260911.pdf) (acesso em 20 de abril de 2013).

FELSOT, A, S. Acrylamide Angst, 2002. Disponível em: <http://www.envirofac.org/Acrylamide%20angst.pdf>. (Acesso em: 10 agosto. 2013.)

FRIEDMAN, M. & LEVIN, C.E. Review of Methods for the Reduction of Dietary Content and Toxicity of Acrylamide. **Food Chemistry**. V. 56, n.09, p.6113 – 6140. 2008.

GUENTHER, H.; ANKLAM, E.; WENZL, T.; STADLER, R.H. Acrylamide in coffee: review of progress in analysis, formation and level reduction. **Food Additive and Contaminants**. V. 24, n.01, p.60 – 70. 2007.

HALFORD, N. G. & BIOLOGISTS, A. o. A. Acrylamide, Furans and Other Food-borne Contaminants. **Plant Science to Food Chemistry: Technical University of Munich, Freising, Germany**, 8-9. Association of Applied Biologists. 2013.

HENDRIKSEN, H. V., KORNBRUST, B. A., OSTERGAARD, P. R. & STRINGER, M. A. Evaluating the Potential for Enzymatic Acrylamide Mitigation in a Range of Food Products Using an Asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 57, p. 4168-4176. 2013.

IARC. Acrylamide. In ***IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 60, Some Industrial Chemicals***, p. 389 – 433. Lyon, France. 1994.

LANTZ, I., TERNITÉ, R., WILKENS, J., HOENICKE, K., GUENTHER, H., VAN DER STEGEN, G.H.D. Studies on acrylamide levels in roasting, storage and brewing of coffee. **Molecular Nutrition and Food Research**. V.50, n.11, p. 1039 – 1046. 2006.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Projeções do Agronegócio : Brasil 2011/2012 a 2021/2022 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília : Mapa/ACS, 2012.

MEDEIROS, V.R.; MESTDAGH, F.; VAN POUCKE, C.; KERKAERT, B.; DE MUER, N.; DENON, Q.; VAN PETEGHEM, C.; DE MEULENAER, B. Implementation of acrylamide mitigation strategies on industrial production of french fries: challenges and pitfalls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.59, n.08, p.898 – 906. 2011.

NERI, V.C.C. **Acrilamida em Alimentos: Formação Endógena e Riscos à Saúde**. PPGUS/INCQS. FIOCRUZ, 2004.

NAIDU, M.M.; SULOCHANAMMA, G.; SAMPATHU, S.R.; SRINIVAS, P. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. **Food Chemistry**. V.107, n.11, p.377 - 384. 2008.

PARZEFALL, W. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.04, p.1360 – 1364. 2008.

PEDRESCHI, F.; KAACK, K.; GRANBY, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in french fries. **Food Chemistry**. V.109, n.04, p.386 – 392. 2008.

PEDRESCHI, F.; MARIOTTI, S.; GRANBY, K.; RISUM, J. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. **Food Science and Technology**. V.44, n.03, p.1473 – 1476. 2011.

PEDRESCHI, F., MARIOTTI, M. S. & GRANBY, K. (2014). Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, V. 94, p. 09-20.

REYNOLDS T. Acrylamide and Cancer: Tunnel Leak in Sweden Prompted Studies. **Journal of National Cancer Institute**. V.94, n.12, p.876 – 878. 2002.

RUBAYIZA, A.B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of Arabica and Robusta coffees by Fourier transform Raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.53, n.10, p.4654 – 4659, 2005.

SNFA (Swedish National Food Agency). Acrylamide in food. Disponível em: [http://www.slv.se/templates/SLV\\_DocumentList.aspx?id=4089](http://www.slv.se/templates/SLV_DocumentList.aspx?id=4089), 2002. (Acesso em 20 de março de 2013).

STADLER, R.H. Acrylamide from Maillard reaction products. **Nature London**. V.419, n.05, p.449 – 450. 2002.

STADLER, R.H.; ROBERT, F.; RIEDIKER, S.; VARGA, N.; DAVIDEK, T.; DEVAUD, S.; GOLDMANN, T.; HAU, J.; BLANK, I. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and others vinylogous compounds by the Maillard reaction. **Food Chemistry**. V.52, n.17, p.5550 – 5558. 2004.

STADLER, R.H. Acrylamide formation in different foods and potential strategies for reduction. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.561, n.11 p.157 – 169. 2005.

SENYUVA, H.Z.; GOKMEN, V. Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. **Food Additives and Contaminants**. V.22, n.3, p.214 - 220. 2005.

TAREKE E.; RYDBERG, P.; KARLSSON, P.; ERIKSSON, S.; TÖRNQVIST, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.50, n.14, p.4998 – 5006. 2002.

TUNCEL, N. B., YILMAZ, N. & SENER, E. (2010). The effect of pea (*Pisum sativum* L)-originated asparaginase on acrylamide formation in certain bread types. **International Journal of Food Science and Technology**, V.45, p. 2470-2476.

WHO (World Health Organization). Acrylamide in food: frequently asked questions. Disponível em:  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide\\_faqs.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide_faqs.pdf) , 2005.  
(acesso em Agosto de 2013).

WHITEHURST, R. J. & VAN OORT, M. Enzymes in Food Technology. **International Journal of Food Science and Technology**. V. 53, p.248-256. 2009.