

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

GIANLUCA PARISI TOBALDINI

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES BASEADAS EM
BIOPOLÍMEROS PARA TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO GRÃO DE
CAFÉ COM L-ASPARAGINASE**

Araraquara, SP

2025

GIANLUCA PARISI TOBALDINI

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES BASEADAS EM BIOPOLÍMEROS
PARA TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO GRÃO DE CAFÉ COM
L-ASPARAGINASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico

Orientador(a): Prof. Dr. Heitor Buzetti Simões Bento
Coorientador(a): Prof. Dr. Leonardo Miziara Barboza
Ferreira

Araraquara, SP

2025

T628d Tobaldini, Gianluca Parisi.
Desenvolvimento de formulações baseadas em biopolímeros
para tratamento enzimático do grão de café com L-asparaginase /
Marcella Monteiro Alvarenga Sayão. – Araraquara, 2025.
43 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) –
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara.

Orientador: Heitor Buzetti Simões Bento.
Coorientador: Leonardo Miziara Barboza Ferreira.

1. Acrilamida. 2. L-asparaginase. 3. Biopolímeros. 4. Café –
Pesquisa. 5. Estabilidade enzimática. I. Bento, Heitor Buzetti
Simões, orient. II. Ferreira, Leonardo Miziara Barboza, coorient. III.
Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

Esta ficha não pode ser modificada

GIANLUCA PARISI TOBALDINI

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES BASEADAS EM BIOPOLÍMEROS
PARA TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO GRÃO DE CAFÉ COM
L-ASPARAGINASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico

Data da defesa: 02/12/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Heitor Buzetti Simões Bento
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Gabriela Barbosa de Paiva
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Enzo Corvello
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

RESUMO

A acrilamida é um composto de preocupação toxicológica formado durante o processamento térmico de alimentos ricos em carboidratos pela reação de Maillard. Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar formulações biopoliméricas contendo a enzima L-asparaginase para o tratamento enzimático de grãos de café, visando mitigar a formação de acrilamida durante a torrefação. Foram realizados ensaios de atividade enzimática e estabilidade térmica com formulações compostas por alginato, carboximetilcelulose (CMC), metilcelulose (Methocel®) e uma combinação CMC/Methocel, submetidas a tratamentos de 40 °C, 50 °C e 60 °C. A atividade enzimática foi determinada pelo método de Nessler, enquanto a quantificação de acrilamida nas amostras torradas foi realizada por HPLC. Os resultados demonstraram que a formulação composta pelo blend CMC/Methocel apresentou desempenho superior, mantendo até 130% da atividade relativa em comparação ao controle. Nos grãos tratados, essa formulação reduziu o teor de acrilamida em cerca de 35% em relação às amostras não tratadas. A análise de textura indicou maior dureza dos grãos após o tratamento, sugerindo melhor integridade estrutural após a torrefação. De forma geral, a incorporação de L-asparaginase em matrizes biopoliméricas derivadas de celulose aumentou significativamente a estabilidade e a eficiência catalítica da enzima, configurando uma alternativa biotecnológica sustentável e de baixo custo para a obtenção de cafés mais seguros e de melhor qualidade.

Palavras-chave: acrilamida; L-asparaginase; biopolímeros; café; estabilidade enzimática.

ABSTRACT

Acrylamide is a compound of toxicological concern formed during the thermal processing of carbohydrate-rich foods through the Maillard reaction. This study aimed to develop and evaluate biopolymer-based formulations containing L-asparaginase for the enzymatic treatment of coffee beans, seeking to mitigate acrylamide formation during roasting. Enzymatic activity and thermal stability assays were performed with formulations composed of alginate, carboxymethylcellulose (CMC), methylcellulose (Methocel®), and a CMC/Methocel blend, subjected to heating at 40 °C, 50 °C, and 60 °C. Enzyme activity was quantified using the Nessler method, while the acrylamide content in roasted samples was determined by HPLC. The results showed that the CMC/Methocel blend provided superior thermal protection, maintaining up to 130% of relative activity compared with the control. In treated coffee beans, this formulation reduced acrylamide levels by approximately 35% relative to untreated samples. Textural analysis indicated increased grain hardness after treatment, suggesting improved structural integrity following roasting. Overall, the incorporation of L-asparaginase into cellulose-based biopolymer matrices significantly enhanced enzymatic stability and catalytic performance, representing a sustainable and low-cost biotechnological alternative for producing safer and higher-quality coffee

Keywords: acrylamide; L-asparaginase; biopolymers; coffee; enzyme stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reação de formação da acrilamida	08
Figura 2 – Estrutura Acrilamida	14
Figura 3 – Estrutura enzima L-asparaginase	15
Figura 4 – Amostras para quantificação de Acrilamida	23
Figura 5 – Equipamento TA-XTplus utilizado para análise de dureza e adesão dos grãos de café	24
Figura 6 – Quantificação de acrilamida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade enzimática relativa para tratamento térmico a 40°C	28
Tabela 2 – Atividade enzimática relativa para tratamento térmico a 50°C	29
Tabela 3 – Atividade enzimática relativa para tratamento térmico a 60°C	30
Tabela 4 – Avaliação da dureza de grãos de café	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CMC – Carboximetilcelulose
EC – Enzyme Commission (Comissão de Enzimas)
FAO – Food and Agriculture Organization
FDA – Food and Drug Administration
HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IARC – International Agency for Research on Cancer
ICO - International Coffee Organization
L-ASNase – L-Asparaginase
MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária
Methocel® – Metilcelulose
NH₃ – Amônia
ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS – Organização Mundial da Saúde
ONU – Organização das Nações Unidas
PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
pH – Potencial Hidrogeniônico
TCA – Ácido Tricloroacético
TRIS-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano cloridrato (Tampão Tris)
U/mL – Unidade de atividade enzimática por mililitro

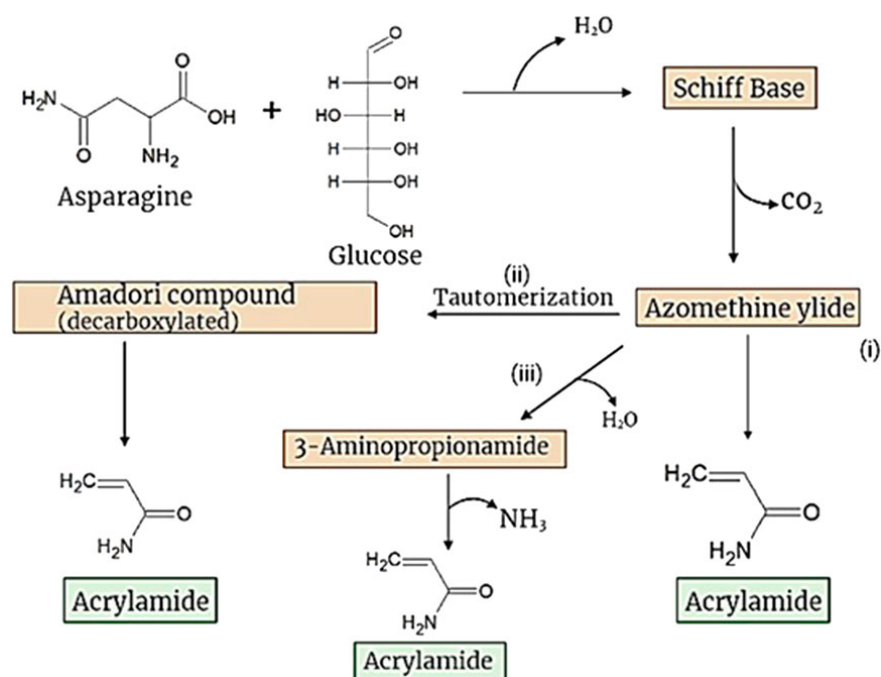
SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Consumo de Café Mundial e no Brasil	10
2.2 Café: Composição química e processamento	11
2.3 Acrilamida	12
2.4 Enzima L-asparaginase	14
2.5 Imobilização enzimática e termoestabilidade	16
2.6 Biopolímeros derivados de Celulose	17
2.7 Aplicação de biopolímeros na indústria de alimentos	19
3 METODOLOGIA	20
3.1 Avaliação da atividade enzimática da L-asparaginase	20
3.2 Avaliação da estabilidade térmica da L-asparaginase em diferentes formulações	20
3.3 Aplicação das formulações e tratamento enzimático do Grão de Café	21
3.4 Método de Quantificação de Acrilamida	22
3.5 Avaliação da Dureza e Adesão por texturômetro	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Avaliação da estabilidade térmica da L-asparaginase em diferentes formulações	26
4.2 Quantificação de Acrilamida no Grão de Café	30
4.3 Avaliação da Dureza e Adesão por texturômetro	32
4.4 Sustentabilidade e potencial econômico/científico	34
5 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A acrilamida é um composto orgânico de reconhecido potencial cancerígeno e neurotóxico, cuja presença em alimentos tem despertado preocupações na área de segurança alimentar (Neri, 2004). Sua formação está associada, principalmente, à reação de Maillard (um processo de escurecimento não enzimático que ocorre em alimentos ricos em carboidratos submetidos a altas temperaturas) no qual açúcares redutores interagem com aminoácidos como a L-asparagina, favorecendo a geração desse composto indesejável (Arisseto; Toledo, 2008). Alimentos como pães, batatas fritas, biscoitos e o café torrado figuram entre as principais fontes dietéticas de acrilamida, o que justifica a atenção de órgãos e estudos internacionais sobre os riscos associados ao consumo contínuo (FAO/WHO, 2019).

Figura 1 – Reação de formação da Acrilamida



Fonte: Jin et al., 2013

Uma das estratégias mais promissoras para reduzir a formação de acrilamida em alimentos é a aplicação da enzima L-asparaginase (L-ASNase), que catalisa a

conversão da L-asparagina em ácido aspártico e amônia, retirando assim o precursor principal da reação (Pedreschl *et al.*, 2011). No caso do café, o teor de acrilamida apresenta variabilidade dependente tanto da espécie botânica quanto do processamento a que os grãos são submetidos; matérias-primas com maiores teores de precursores, sobretudo L-asparagina, tendem a gerar maiores concentrações de acrilamida após a torrefação (Medeiros *et al.*, 2011; Lantz *et al.*, 2006; Pedreschi *et al.*, 2014).

Apesar de seu potencial, a aplicação industrial da L-ASNase é limitada por propriedades intrínsecas da enzima, como baixa estabilidade térmica, tempo de meia-vida reduzido e sensibilidade a condições de processamento, o que compromete sua atividade catalítica em processos que envolvem temperaturas elevadas (Krishnapura *et al.*, 2016; Chand *et al.*, 2020). Por isso, o desenvolvimento de abordagens que aumentem a robustez e o desempenho da enzima é essencial para tornar viável seu uso em escala tecnológica e industrial (Muhammad *et al.*, 2019).

Nesse contexto, os biopolímeros surgem como matrizes promissoras para imobilização e formulação enzimática, por formarem microambientes capazes de proteger a estrutura tridimensional da enzima e, conseqüentemente, prolongar sua atividade em condições adversas. Materiais de origem natural (alginato, quitosana e derivados de celulose) têm sido amplamente investigados por suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de modificação química, além da presença de grupos funcionais (ex.: hidroxilas) que favorecem interações físico-químicas com biomoléculas (Muhammad *et al.*, 2019).

Estudos demonstram que o encapsulamento ou dispersão de enzimas em matrizes celulósicas e blends poliméricos pode melhorar a termoestabilidade e a eficiência catalítica, ampliando as possibilidades de aplicação em alimentos sólidos como o grão de café (Kim *et al.*, 2012; Muhammad *et al.*, 2019).

Assim, este trabalho propõe estudar formulações à base de biopolímeros contendo L-asparaginase para o tratamento enzimático do grão de café, com o objetivo de mitigar a formação de acrilamida durante a torrefação. A investigação

valoriza não apenas o desenvolvimento de uma solução tecnicamente eficaz, mas também a compatibilidade com princípios de sustentabilidade, ao priorizar materiais renováveis e abordagens aplicáveis à cadeia produtiva do café.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Consumo de Café Mundial e no Brasil

O consumo mundial de café vem crescendo de forma constante nas últimas décadas, refletindo a relevância econômica e cultural dessa commodity no mercado global. Segundo estimativas da Organização Internacional do Café, o consumo global ultrapassou 168,1 milhões de sacas de 60 kg em 2024, o que representa aproximadamente 40% de todo o comércio internacional de café (ICO, 2023). O Brasil mantém-se como o maior produtor e exportador mundial, com um volume recorde de 50,44 milhões de sacas exportadas em 2024, das quais cerca de 36,9 milhões corresponderam à variedade Arábica (ICO, 2023). Internamente, o país também apresenta expressivo consumo doméstico, ocupando a segunda posição entre os maiores consumidores mundiais, com mais de 22 milhões de sacas consumidas anualmente (FAO/WHO, 2019).

Apesar dessa expressiva representatividade, parte do café brasileiro ainda enfrenta desafios de aceitação nos mercados internacionais, principalmente na Europa, onde há exigências rigorosas quanto à qualidade sensorial, sustentabilidade e conformidade com parâmetros de segurança alimentar (FAO/WHO, 2019). Questões como variação no processamento, instabilidade química durante a torra e teores residuais de acrilamida podem afetar a padronização e reduzir o valor agregado do produto (ICO, 2023).

Nesse contexto, torna-se evidente o potencial estratégico de pesquisas voltadas à melhoria da qualidade e segurança do café exportado pelo Brasil, especialmente por meio de abordagens biotecnológicas. Estudos que empreguem enzimas estabilizadas por biopolímeros, como a L-asparaginase, podem contribuir para reduzir a formação de compostos indesejáveis durante a torra e, consequentemente, elevar o padrão de qualidade dos cafés brasileiros. Essa

inovação tecnológica está alinhada às demandas de mercados internacionais e aos princípios de sustentabilidade, permitindo agregar valor ao produto nacional, fortalecer a imagem do Brasil como exportador premium e ampliar a participação em segmentos que priorizam cafés certificados e de origem sustentável (FAO/WHO, 2019; ICO, 2023).

2.2 Café: Composição química e processamento

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e uma das commodities agrícolas de maior relevância econômica e social. Seu valor sensorial e comercial está diretamente relacionado à complexa composição química dos grãos, que inclui carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios, ácidos clorogênicos, minerais e alcalóides como a cafeína (Medeiros *et al.*, 2011). Esses componentes desempenham papel fundamental nas transformações físico-químicas que ocorrem durante a torrefação, influenciando características como cor, aroma e sabor. No grão verde, os açúcares redutores (glicose e frutose) e o aminoácido L-asparagina se destacam como precursores essenciais da reação de Maillard, processo responsável pela formação dos compostos voláteis e pigmentos escuros típicos do café torrado (Arisseto; Toledo, 2008).

Durante o processo de torrefação, que ocorre geralmente entre 180 °C e 240 °C, há uma série de reações térmicas complexas, incluindo pirólise, oxidação e condensação, que alteram significativamente a estrutura química do grão (Lantz *et al.*, 2006). A intensidade da torra influencia não apenas o perfil sensorial, mas também a concentração de compostos bioativos e contaminantes formados termicamente, como a acrilamida. Torras mais leves tendem a apresentar maior teor de acrilamida, devido à sua formação predominante nas etapas iniciais do aquecimento, enquanto torra mais escura pode promover sua degradação parcial (Pedreschi *et al.*, 2014). A compreensão dessas transformações é essencial para o desenvolvimento de estratégias de processamento que mantenham as propriedades sensoriais desejáveis e, simultaneamente, reduzam os riscos à saúde associados à presença de compostos potencialmente tóxicos. Nesse contexto, abordagens biotecnológicas, como o uso de enzimas estabilizadas por biopolímeros, surgem como alternativas inovadoras para otimizar o tratamento do grão de café e minimizar

a formação de produtos indesejáveis sem comprometer sua qualidade comercial (Pedreschi *et al.*, 2011)

2.3 Acrilamida

A presença de acrilamida em alimentos representa risco à saúde devido ao seu potencial cancerígeno e neurotóxico estabelecido. A sua formação nos alimentos está diretamente relacionada com seus precursores, os açúcares redutores e asparagina que é o principal aminoácido na reação de Maillard responsável pela formação da acrilamida (Neri, 2004).

De acordo com o relatório conjunto da FAO/WHO (2019), a acrilamida é classificada como “provavelmente carcinogênica para humanos” (Grupo 2A), conforme a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC). Estudos toxicológicos em modelos animais demonstraram que a exposição prolongada pode causar alterações genéticas e danos ao sistema nervoso periférico e central. Embora a toxicidade depende da dose e da frequência de ingestão, o consumo contínuo de alimentos contendo acrilamida (especialmente frituras, batatas processadas, biscoitos, pães e café torrado) é motivo de preocupação, visto que esses produtos representam as principais fontes dietéticas do composto (FAO/WHO, 2019; Ariseto; Toledo, 2008).

A reação de Maillard é um processo de escurecimento não enzimático que ocorre nos alimentos ricos em carboidratos submetidos a uma temperatura acima de 120 ° C sendo fritos, assados ou torrados, produzindo um rearranjo no complexo açúcar-proteína influenciando na cor e no sabor do produto (Ariseto; Toledo, 2008). Desta forma, ocorre em diversos alimentos, principalmente, nas frituras, pães, biscoitos e no café torrado, sendo estes, os principais responsáveis pela ingestão de acrilamida no mundo (FAO/WHO, 2019).

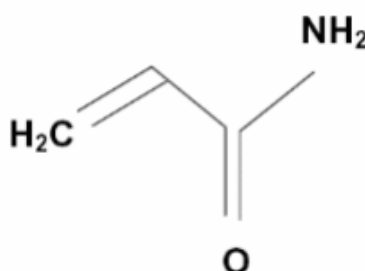
Embora essa reação seja essencial para o desenvolvimento de cor, aroma e sabor característicos em diversos alimentos, ela também é responsável pela geração de substâncias indesejáveis, como a acrilamida, cujos efeitos adversos sobre a saúde humana vêm sendo amplamente discutidos (FAO/WHO, 2019).

A formação da acrilamida nos alimentos é fortemente influenciada por fatores tecnológicos e biológicos, como a composição da matéria-prima, o teor de açúcares redutores e de L-asparagina, a umidade do produto e as condições de processamento térmico (Medeiros *et al.*, 2011; Lantz *et al.*, 2006).

A aplicação de estratégias biotecnológicas tem se mostrado uma alternativa promissora para reduzir a formação de acrilamida em alimentos, destacando-se o uso da enzima L-asparaginase (EC 3.5.1.1, L-asparagina amidohidrolase). Essa enzima atua de forma específica sobre o aminoácido L-asparagina, convertendo-o em ácido aspártico e amônia antes que ocorra a reação de Maillard, principal responsável pela geração de acrilamida durante o aquecimento de produtos ricos em carboidratos (Pedreschi *et al.*, 2011).

Portanto, compreender os mecanismos de formação da acrilamida e as variáveis que controlam sua concentração nos alimentos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias tecnológicas eficazes e sustentáveis, especialmente em produtos de alto consumo e valor comercial como o café. Portanto, a utilização de enzimas estabilizadas em biopolímeros naturais representa uma perspectiva inovadora, capaz de melhorar a eficiência catalítica da L-asparaginase durante o processamento térmico, contribuindo para a produção de alimentos mais seguros e alinhados às exigências dos consumidores e órgãos reguladores.

Figura 2 – Estrutura Acrilamida



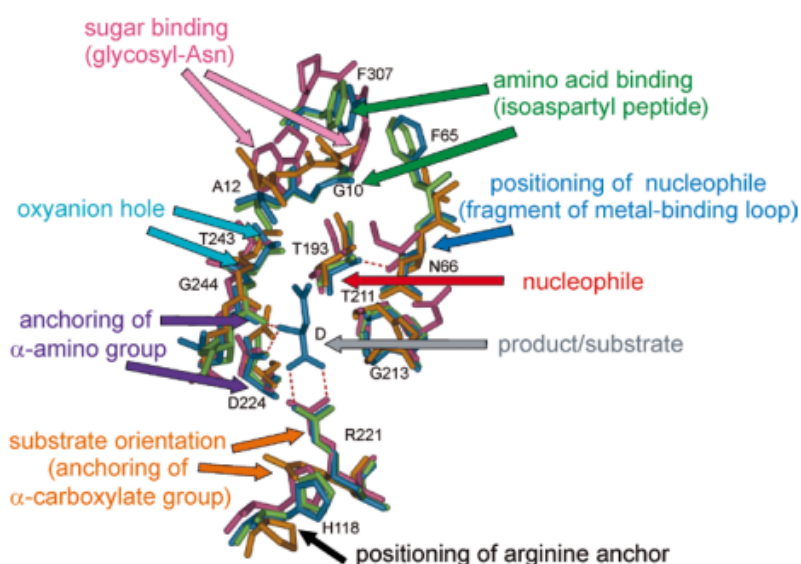
Fonte: Adaptado de Quali - Segurança Alimentar, 2015

2.4 Enzima L-asparaginase

A L-ASNase é uma enzima que tem potencial para catalisar a hidrólise da asparagina gerando os produtos aspartato e amônia (Saeed *et al.*, 2021). Diversos

seres vivos como as plantas e animais produzem essa enzima e diversos microrganismos como os fungos e bactérias são capazes de produzi-la. (Muneer *et al*, 2019).

Figura 3 – Estrutura Enzima L-asparaginase



Fonte: Adaptado de Michalska *et al.* (2006)

O seu interesse comercial e a alta demanda da indústria está relacionado a sua capacidade de hidrolisar a L-asparagina possuindo diversas aplicações tanto na indústria de biofármacos, devido sua eficiência como agente oncológico, como também na indústria alimentícia, a partir do seu potencial em mitigar formação de acrilamida nos alimentos de consumo mundial como, principalmente, o café e a batata frita. (Chand *et al.* 2020).

Entretanto, ambas indústrias enfrentam dificuldades no tratamento enzimático com a L-ASNase relacionadas às suas propriedades como a baixa estabilidade, tempo de meia-vida e termoestabilidade. A temperatura, por exemplo, afeta diretamente o poder catalítico e a estabilidade da enzima. (Krishnapura *et al.* 2016).

Desta forma, a tecnologia enzimática é uma área de bastante interesse para a indústria a medida que procura estratégias para melhorar características enzimáticas permitindo um melhor processamento enzimático podendo ser mais eficiente e com

menor custo aumentando, por exemplo, a sua estabilidade, termoestabilidade e poder catalítico (Muhammad *et al.* 2019).

Destaca-se a utilização de biopolímeros em formulações enzimáticas como uma estratégia para melhorar as características da enzima L-ASNase. A sua termoestabilidade pode ser modificada através de uma formulação contendo um biopolímero derivado de celulose, por exemplo. (Kim *et al.* 2012).

2.5 Imobilização enzimática e termoestabilidade

A imobilização enzimática é uma estratégia amplamente empregada para aumentar a estabilidade, reutilização e eficiência catalítica de enzimas em processos industriais. Essa técnica consiste na fixação da enzima em um suporte sólido, gel ou matriz polimérica, mantendo sua atividade biológica enquanto melhora suas propriedades físico-químicas (CAO, 2005). A imobilização pode ocorrer por adsorção física, ligação covalente, encapsulamento ou aprisionamento em matrizes poliméricas, sendo a escolha do método e do suporte determinante para o desempenho final do biocatalisador (Bilal; IQBAL, 2019).

Entre as principais vantagens dessa abordagem estão o aumento da termoestabilidade, resistência a variações de pH e possibilidade de reutilização da enzima, fatores que reduzem custos e ampliam sua aplicabilidade em escala industrial.

A termoestabilidade enzimática é um parâmetro crucial para processos industriais que envolvem aquecimento, como a torrefação de café ou o tratamento de substratos alimentícios. A estabilidade térmica está diretamente relacionada à manutenção da estrutura tridimensional da proteína sob variação de temperatura, e sua perda resulta em desnaturação e inativação catalítica (Krishnapura *et al.*, 2016).

Diversas estratégias vêm sendo utilizadas para aumentar a termoestabilidade das enzimas, como modificação química, engenharia de proteínas e imobilização em suportes poliméricos (Muhammad *et al.*, 2019). No caso específico da L-asparaginase, a imobilização em biopolímeros derivados de celulose, alginato ou quitosana tem se mostrado uma alternativa eficaz para preservar sua estrutura ativa e prolongar a atividade catalítica sob condições de aquecimento (Kim *et al.*, 2012).

Além disso, o suporte atua como uma barreira física que reduz a mobilidade molecular da enzima e limita a exposição direta ao calor, minimizando processos de desnaturação. Assim, o uso de biopolímeros na imobilização enzimática representa uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de formulações termoestáveis, aplicáveis em alimentos e outros sistemas biotecnológicos, alinhando eficiência técnica e sustentabilidade.

2.6 Biopolímeros derivados de Celulose

Os biopolímeros são macromoléculas naturais formadas por unidades monoméricas provenientes de fontes renováveis, como plantas, microrganismos e animais, e vêm ganhando destaque como alternativas sustentáveis aos polímeros sintéticos derivados do petróleo. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, abundância e ausência de toxicidade, esses materiais têm sido amplamente aplicados nas indústrias farmacêutica, biomédica e alimentícia, sobretudo em processos que envolvem imobilização de enzimas e estabilização de biocatalisadores (Muhammad *et al.*, 2019). A capacidade de os biopolímeros formarem um microambiente protetor ao redor das moléculas enzimáticas reduz os efeitos de desnaturação térmica e aumenta a eficiência catalítica, prolongando a atividade das enzimas em sistemas complexos.

Dentre os diversos tipos de biopolímeros estudados, destacam-se o alginato, a quitosana e, principalmente, a celulose e seus derivados, que têm se mostrado altamente eficientes como matrizes para imobilização enzimática (Bilal; IQBAL, 2019). A celulose é o polímero natural mais abundante na biosfera e apresenta características estruturais que favorecem sua utilização como suporte, como a presença de numerosos grupos hidroxila capazes de estabelecer ligações de hidrogênio e interações químicas com as proteínas (Muhammad *et al.*, 2019). Essa estrutura confere ao material alta capacidade de adsorção e modificação química, permitindo o desenvolvimento de derivados com propriedades específicas, como solubilidade, viscosidade e flexibilidade ajustáveis (Muhammad *et al.*, 2019).

Entre os derivados da celulose, dois se destacam pela ampla aplicação em sistemas biotecnológicos e de imobilização enzimática: a carboximetilcelulose (CMC)

e a metilcelulose (Methocel®). A CMC é obtida pela substituição parcial dos grupos hidroxila da celulose por grupos carboximetil, o que aumenta sua solubilidade em água e capacidade de formação de géis estáveis. Essa característica torna a CMC um excelente suporte para enzimas, especialmente em sistemas aquosos e alimentícios, pois melhora a dispersão da enzima, a estabilidade térmica e a resistência a variações de pH (Muhammad *et al.*, 2019). Além disso, a CMC atua como agente espessante e estabilizante em formulações, podendo também contribuir para o controle da liberação de compostos ativos (Muhammad *et al.*, 2019).

Já a Methocel® (metilcelulose), derivado obtido pela substituição dos grupos hidroxila por metilas, apresenta comportamento termogelificante, formando géis reversíveis sob aquecimento (propriedade particularmente útil para aplicações em alimentos e bioprocessos que envolvem variações térmica) (Kim *et al.*, 2012). Essa característica permite que a Methocel mantenha a integridade estrutural da enzima sob condições de aquecimento, reduzindo a desnaturação térmica e prolongando a atividade catalítica. Além disso, por ser um material biocompatível, inodoro e não iônico, a Methocel pode interagir de forma suave com biomoléculas, preservando sua atividade funcional (Kim *et al.*, 2012).

A combinação entre CMC e Methocel em formulações híbridas tem se mostrado uma estratégia promissora para otimizar a imobilização e a estabilidade de enzimas, unindo a solubilidade e maleabilidade da CMC com a resistência térmica e estrutura gelificante da Methocel. Tais sistemas são particularmente interessantes para aplicações em processos enzimáticos em alimentos submetidos ao calor, como o tratamento do grão de café com L-asparaginase, pois permitem um equilíbrio entre adesão à superfície do substrato e proteção térmica da enzima.

Assim, os biopolímeros derivados da celulose representam um campo de grande interesse tecnológico e científico, com potencial de aplicação não apenas na melhoria da estabilidade e eficiência de enzimas industriais, mas também no desenvolvimento de soluções sustentáveis que atendam às exigências de segurança e qualidade alimentar, como é o caso da mitigação da formação de acrilamida durante o processamento térmico de alimentos.

2.7 Aplicação de biopolímeros na indústria de alimentos

Os biopolímeros têm desempenhado papel crescente na indústria de alimentos devido à sua versatilidade funcional e caráter sustentável, atuando como agentes espessantes, emulsificantes, encapsulantes e estabilizantes em diversas formulações (Muhammad *et al.*, 2019).

Além dessas funções tecnológicas, seu uso em processos biotecnológicos tem se expandido, especialmente como suportes para imobilização enzimática, permitindo o aumento da estabilidade e reusabilidade de biocatalisadores em ambientes térmica ou quimicamente adversos (Bilal; IQBAL, 2019). Biopolímeros como alginato, quitosana e derivados da celulose incluindo carboximetilcelulose (CMC) e metilcelulose (Methocel®), são amplamente empregados na estabilização de enzimas aplicadas a produtos alimentícios, contribuindo para melhorar a textura, prolongar a vida de prateleira e reduzir a formação de compostos indesejáveis durante o processamento térmico (Kim *et al.*, 2012). Destaca-se então, que a integração desses materiais ao desenvolvimento de sistemas enzimáticos sustentáveis representa um avanço significativo para a indústria, unindo inovação tecnológica, segurança alimentar e responsabilidade ambiental.

3 METODOLOGIA

3.1 Avaliação da atividade enzimática da L-asparaginase

Para todos os ensaios foram utilizados L-ASNase de *Escherichia coli* adquirida comercialmente.

A atividade de L-asparaginase foi quantificada considerando a liberação de NH₃ a partir da hidrólise de L-asparagina e utilizando a metodologia de quantificação colorimétrica de Nessler. As reações enzimáticas foram realizadas a 37 °C, por 10 minutos em tampão TRIS-HCl pH 8,6 com solução de L- asparagina 189 mM. A reação foi interrompida pela adição de 0,25 mL de TCA 1,5 M. As amostras foram então centrifugadas e analisadas por espectrofotometria (436 nm) em microplaca pela reação de Nessler. Os dados foram obtidos em função de uma curva padrão de sulfato de amônio. Os valores de atividades foram calculados considerando a Equação 1 abaixo.

$$Atividade\ L - ASNase\ (U\ mL^{-1}) = \frac{C_{[NH_3]} \times V_R \times V_{Nessler}}{V_T \times t_R \times V_E} \quad (1)$$

Onde: C[NH₃] = Concentração de amônia em solução (μmol mL⁻¹), V_R = volume total da reação enzimática, V_{Nessler} = volume total da mistura para quantificação de amônica com Nessler (mL), V_T = Volume de V_R transferido para o tubo com o reativo de Nessler e água (mL), t_R = tempo da reação enzimática (min) e V_E = volume total de extrato enzimático adicionado na reação (mL) (Magri et al., 2018).

3.2 Avaliação da estabilidade térmica da L-asparaginase em diferentes formulações

A estabilidade térmica da enzima L-asparaginase (L-ASNase) foi avaliada com base na variação de sua atividade enzimática após exposição a diferentes temperaturas, de modo a comparar o desempenho das formulações contendo distintos biopolímeros. Foram testadas formulações preparadas com alginato, metilcelulose (Methocel®), carboximetilcelulose (CMC) e um blend composto por Methocel® e CMC, a fim de verificar o efeito de cada matriz polimérica sobre a estabilidade da enzima frente ao aquecimento.

As amostras foram incubadas em banho termostatzado nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C. A atividade enzimática foi mensurada em função do tempo e temperatura de incubação, sendo os valores expressos em atividade relativa (%) em relação à atividade inicial, considerada como 100%, correspondente à atividade da enzima não submetida ao tratamento térmico. A partir dessa referência, foi possível quantificar a perda ou manutenção da atividade catalítica em função da temperatura e do tempo de exposição.

Os resultados obtidos a partir dessa avaliação permitiram comparar o desempenho protetor dos diferentes biopolímeros, identificando quais formulações apresentaram maior capacidade de preservar a estrutura e a atividade da L-ASNase sob condições de estresse térmico. Essa abordagem metodológica possibilita compreender o papel dos biopolímeros na modulação do microambiente enzimático, fornecendo subsídios para selecionar as formulações mais promissoras para aplicações que demandem maior termoestabilidade e eficiência catalítica.

3.3 Aplicação das formulações e tratamento enzimático do Grão de Café

Com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores de avaliação da atividade e estabilidade térmica, foi selecionada a formulação biopolimérica mais eficiente na preservação da atividade da enzima L-asparaginase. A formulação escolhida consistiu em um blend dos biopolímeros carboximetilcelulose (CMC) e metilcelulose (Methocel®) na concentração de 0,25 g/mL, contendo 200 U/mL de L-asparaginase, o que corresponde a 100 U de enzima para cada grama de grão de café utilizado.

Para o ensaio de aplicação, foram preparadas amostras contendo 2 g de grãos de café in natura acondicionadas em tubos reagentes de 15 mL, organizadas em três grupos experimentais distintos, todos realizados em triplicata. O Grupo A (controle) consistiu em grãos tratados com volume suficiente para cobrir os grãos de tampão fosfato (PBS, pH 7,0) apenas, sem adição de enzima ou biopolímero. O Grupo B foi tratado com tampão fosfato contendo L-asparaginase comercial, sem presença de biopolímero. Por fim, o Grupo C (formulação teste) recebeu a solução enzimática incorporada à formulação biopolimérica selecionada (CMC + Methocel),

mantendo o mesmo volume total de solução em todos os grupos, de modo a garantir a completa cobertura dos grãos.

Após a adição das soluções, todos os tubos foram submetidos a tratamento enzimático em banho-maria a 40 °C por 1 hora, sob condições estáticas, permitindo a interação da enzima com o substrato superficial dos grãos. Concluído o tratamento, os grãos foram cuidadosamente lavados com água destilada para remoção de resíduos de tampão e formulação, e em seguida submetidos ao processo de torrefação.

O processo de torrefação foi realizado em duas etapas: inicialmente, os grãos foram secos a 100 °C por 5 minutos em mufla para eliminação da umidade superficial. Na sequência, procedeu-se à torrefação a 245 °C por 14 minutos, em béqueres de vidro, até o escurecimento característico do café torrado. Após o término da torra, os grãos foram retirados, resfriados à temperatura ambiente, e então moídos manualmente em moedor de grãos. O pó obtido foi armazenado em frascos herméticos protegidos da luz e da umidade, sendo posteriormente destinado à quantificação do teor residual de acrilamida.

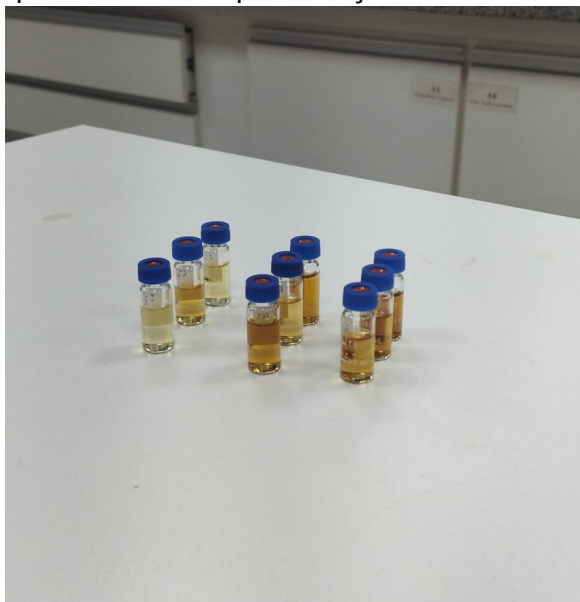
3.4 Método de Quantificação de Acrilamida

A quantificação de acrilamida nos grãos de café tratados foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD), conforme metodologia adaptada de Meghavarnam e Janakiraman (2018), originalmente desenvolvida para amostras de batata frita. Inicialmente, procedeu-se à extração da acrilamida a partir do café torrado e moído, utilizando metanol como solvente extrator. Para cada 1 g de amostra de café, foram adicionados 10 mL de metanol, realizando-se agitação constante em shaker por 15 minutos a temperatura ambiente, com o objetivo de promover a solubilização dos compostos polares presentes na matriz.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos, permitindo a separação do sobrenadante metanólico, que foi cuidadosamente coletado e submetido a filtração para remoção de partículas sólidas. Para eliminação de interferentes lipídicos provenientes da matriz do café, foi adicionado hexano (10 mL) ao metanol recuperado, promovendo a separação de fases. Após a decantação,

a fase metanólica foi recolhida, novamente filtrada em membrana de nylon de 0,2 μm , e armazenada em vials de vidro devidamente identificados para posterior análise cromatográfica.

Figura 4 – Três grupos experimentais de amostras para análise do teor de Acrilamida pelo método de quantificação HPLC



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

A fase móvel utilizada no HPLC foi composta por uma mistura de 97% de acetonitrila e 3% de ácido acético 0,5M (v/v), previamente desgaseificada em banho de ultrassom por 1 hora para remoção de bolhas de ar e estabilização do sistema. As análises foram realizadas sob as mesmas condições cromatográficas padronizadas, abrangendo as amostras dos três grupos experimentais (Controle, Enzima comercial e Formulação biopolimérica), todas conduzidas em triplicata.

Os cromatogramas obtidos foram avaliados a partir dos picos característicos de acrilamida, identificados com base no tempo de retenção da substância padrão. A quantificação foi expressa por meio da área dos picos correspondentes, permitindo a comparação estatística entre os grupos experimentais. A partir dos valores médios e dos respectivos desvios-padrão, foi possível determinar o efeito do tratamento enzimático e da formulação biopolimérica selecionada na redução do teor final de acrilamida presente nas amostras de café torrado.

3.5 Avaliação da Dureza e Adesão por texturômetro

A avaliação das propriedades mecânicas dos grãos de café foi conduzida com o objetivo de determinar a dureza e a adesão das amostras submetidas aos diferentes tratamentos enzimáticos. Os ensaios foram realizados em um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra), utilizando metodologia adaptada para análise de grãos inteiros, a fim de investigar possíveis alterações estruturais decorrentes do uso das formulações biopoliméricas.

Figura 5 –Equipamento TA-XTplus utilizado para análise de dureza e adesão dos grãos de café



Fonte: *Stable Micro Systems*. Disponível em:

<https://www.directindustry.com/pt/prod/stable-micro-systems/product-27393-1658407.html>. Acesso em: 11 out. 2025.

Os grãos torrados, provenientes dos três grupos experimentais: Grupo A (controle), Grupo B (enzima comercial) e Grupo C (formulação biopolimérica selecionada) foram analisados em triplicata. Antes dos ensaios definitivos, foram conduzidos testes preliminares para padronização das condições instrumentais, visto que o equipamento não havia sido previamente utilizado para este tipo de amostra. A partir desses testes, foram definidos os parâmetros ideais de compressão, garantindo a reprodutibilidade e a precisão das medições.

Durante os ensaios, cada grão foi fixado na base do equipamento, enquanto a probe metálica (P/5S) realizou o movimento de compressão sobre sua superfície. O equipamento foi operado no modo de compressão (Test Mode: Compression), com velocidade de pré-teste de 1,5 mm/s, velocidade de teste de 2,0 mm/s, e velocidade pós-teste de 10 mm/s. O deslocamento da sonda foi de 1,0 mm, com acionamento automático ao atingir uma força de disparo de 500 g. O parâmetro extraído para análise foi a dureza do grão, expressa em termos da força máxima necessária para causar a fissura e o rompimento completo da amostra. Esses valores foram registrados e utilizados para comparar as características mecânicas entre os diferentes grupos experimentais.

Além da análise de dureza, foi realizado um teste complementar de adesão, com o intuito de avaliar a resistência de fixação dos grãos quando imersos em água e na formulação biopolimérica selecionada. Nesse ensaio, o texturômetro mediu a força de resistência à separação no momento da retirada do grão das soluções, permitindo comparar o comportamento adesivo e a força de interação entre as diferentes superfícies. Essa análise visou determinar se a formulação biopolimérica confere maior adesividade e resistência mecânica ao revestimento dos grãos, características desejáveis para a aplicação prática em processos industriais.

A avaliação das propriedades mecânicas dos grãos de café tratados, por meio dos ensaios de dureza e adesão, foi conduzida com o objetivo de investigar possíveis alterações estruturais decorrentes do tratamento enzimático e da aplicação das formulações biopoliméricas. Esses parâmetros são fundamentais para compreender o impacto do processo sobre a integridade física do grão após a torra, uma vez que modificações na resistência mecânica podem influenciar diretamente etapas subsequentes da cadeia produtiva, como manuseio, transporte, moagem e armazenamento. Além disso, a presença de biopolímeros na superfície do grão pode resultar na formação de uma camada contínua ou semicontínua, capaz de alterar tanto a resistência à ruptura quanto o comportamento adesivo do material. Assim, os ensaios de dureza e adesão permitem correlacionar os efeitos físico-mecânicos do tratamento com possíveis implicações tecnológicas e sensoriais, contribuindo para

uma avaliação mais abrangente da viabilidade do uso de formulações biopoliméricas associadas à L-asparaginase no processamento de grãos de café.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da estabilidade térmica da L-asparaginase em diferentes formulações

A avaliação da estabilidade térmica da L-asparaginase foi conduzida utilizando inicialmente duas amostras controle, empregadas como referência para o cálculo das atividades relativas das demais formulações biopoliméricas. O primeiro controle corresponde à amostra considerada como 100% de atividade enzimática, composta apenas pela formulação enzimática sem adição de biopolímeros e não submetida ao tratamento térmico. Dessa forma, essa condição representa a atividade enzimática íntegra (1 U/mL), uma vez que não há degradação da enzima pelo calor, servindo como parâmetro base para comparação.

O segundo controle, por sua vez, foi constituído pela mesma formulação enzimática, também sem biopolímeros, mas submetida ao aquecimento nas diferentes temperaturas testadas. Essa amostra permitiu determinar a perda natural de atividade da L-asparaginase decorrente do efeito térmico, ou seja, a degradação normal da enzima quando exposta ao calor. A partir desses valores de referência foi possível avaliar o desempenho das formulações contendo biopolímeros, comparando sua estabilidade térmica com a dos controles e expressando os resultados em termos de atividade relativa (%), conforme apresentado na Tabela 1, 2 e 3.

Tabela 1 – Atividade enzimática relativa para tratamento térmico a 40°C com formulações de diferentes concentrações de biopolímeros com L-Asparaginase 1U/mL

Amostra	[] mg/mL	média ± desvio	Atv.relativa (%)
controle (sem aquecimento)	-	0,124 ± 0,01	100
controle sem formulação	-	0,101 ± 0,01	81,4
Alginate	0,125	0,040 ± 0,06	32,3
Alginate	0,250	0,103 ± 0,003	83,3
Alginate	0,500	0,104 ± 0,005	84,1
CMC	0,125	0,021 ± 0,007	17,0
CMC	0,250	0,086 ± 0,049	69,8
CMC	0,500	0,092 ± 0,012	74,1
Methocel	0,125	0,064 ± 0,004	52,0
Methocel	0,250	0,117 ± 0,008	94,3
Methocel	0,500	0,137 ± 0,003	110,5
CMC+Meth	0,500	0,190 ± 0,001	153,4

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Tabela 2 – Atividade enzimática relativa para tratamento térmico a 50°C com formulações de diferentes concentrações de biopolímeros com L-Asparaginase 1U/mL

Amostra	[] mg/mL	média ± desvio	Atv.relativa (%)
controle (sem aquecimento)	-	0,199 ± 0,012	100,0
controle sem formulação	-	0,122 ± 0,008	61,2
Alginate	0,125	0,039 ± 0,024	19,7
Alginate	0,250	0,154 ± 0,007	77,4
Alginate	0,500	0,174 ± 0,009	87,1
CMC	0,125	0,046 ± 0,006	23,1
CMC	0,250	0,064 ± 0,006	31,9
CMC	0,500	0,200 ± 0,010	100,5
Methocel	0,125	0,106 ± 0,020	53,0
Methocel	0,250	0,127 ± 0,002	63,9
Methocel	0,500	0,213 ± 0,013	107,0
CMC+Meth	0,500	0,263 ± 0,008	131,8

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Tabela 3 – Atividade enzimática relativa para tratamento térmico a 60°C com formulações de diferentes concentrações de biopolímeros com L-Asparaginase 1U/mL

Amostra	[] mg/mL	média ± desvio	Atv.relativa (%)
controle (sem aquecimento)	-	0,199 ± 0,012	100,0
controle sem formulação	-	0,021 ± 0,002	10,4
Alginato	0,250	0,018 ± 0,031	0,0
Alginato	0,500	0,045 ± 0,018	22,4
CMC	0,250	0,010 ± 0,001	4,8
CMC	0,500	0,017 ± 0,003	8,5
Methocel	0,250	0,020 ± 0,017	10,2
Methocel	0,500	0,028 ± 0,006	13,9
CMC+Meth	0,500	0,009 ± 0,003	4,3

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os resultados apresentados na Tabela 1 evidenciam diferenças na estabilidade térmica da L-asparaginase entre as distintas formulações biopoliméricas e temperaturas testadas. A 40 °C, as formulações com alginato em concentrações de 0,25 e 0,50 mg/mL mantiveram cerca de 84 % de atividade enzimática, valores ligeiramente superiores ao controle submetido ao aquecimento, que apresentou aproximadamente 80 % de atividade residual. As formulações com Methocel mostraram desempenho ainda mais favorável, especialmente em 0,25 mg/mL (94 %) e 0,50 mg/mL (110 %), indicando um efeito protetor pronunciado do polímero frente à desnaturação térmica. O destaque foi observado para o blend Methocel + CMC (0,50 mg/mL), que apresentou a maior atividade relativa (153 %), sugerindo sinergismo entre os biopolímeros na manutenção e até potencialização da atividade catalítica sob aquecimento moderado.

A 50 °C, o padrão de estabilidade seguiu tendência semelhante. As formulações com alginato (0,25 mg/mL – 77 %; 0,50 mg/mL – 87 %) apresentaram maior retenção de atividade do que o controle com aquecimento ($\approx$ 60 %). A CMC (0,50 mg/mL) manteve cerca de 100 % da atividade, demonstrando boa resistência térmica, enquanto as amostras com Methocel (0,25 mg/mL – 63 %; 0,50 mg/mL – 107 %) exibiram comportamento estável. Novamente, a combinação CMC + Methocel (0,50 mg/mL) destacou-se como a formulação mais eficiente, atingindo 131 % de atividade relativa, confirmando o efeito protetor combinado. Em contraste, a 60 °C, observou-se uma queda acentuada da atividade para todas as formulações, reflexo da intensa desnaturação da enzima. Nessa condição, alginato 0,50 mg/mL manteve 22,4 %, enquanto Methocel 0,25 mg/mL (10,2 %) e 0,50 mg/mL (13,9 %) apresentaram valores baixos, indicando que acima de 50 °C a inativação térmica da L-asparaginase se torna predominante, limitando o efeito estabilizador dos biopolímeros.

Por outro lado, algumas formulações em baixas concentrações apresentaram atividade inferior à do controle aquecido, comportamento que pode ser explicado por diferentes fatores físico-químicos. Em níveis reduzidos, certos biopolímeros podem interagir adversamente com a enzima, comprometendo sua conformação e reduzindo sua atividade catalítica. Além disso, alterações no microambiente enzimático, como variações na viscosidade e na difusão do substrato, podem dificultar a interação enzima–substrato (SHELDON; VAN PELT, 2013). Outro fator possível é a interferência com o reagente de Nessler, que pode subestimar a leitura da atividade real. Esses resultados reforçam que a eficácia estabilizadora depende fortemente da concentração ideal do biopolímero, sendo que Methocel, CMC e, sobretudo, o blend entre ambos, demonstraram o melhor desempenho na proteção térmica da L-asparaginase nas condições analisadas.

4.2 Quantificação de Acrilamida no Grao de Cafe

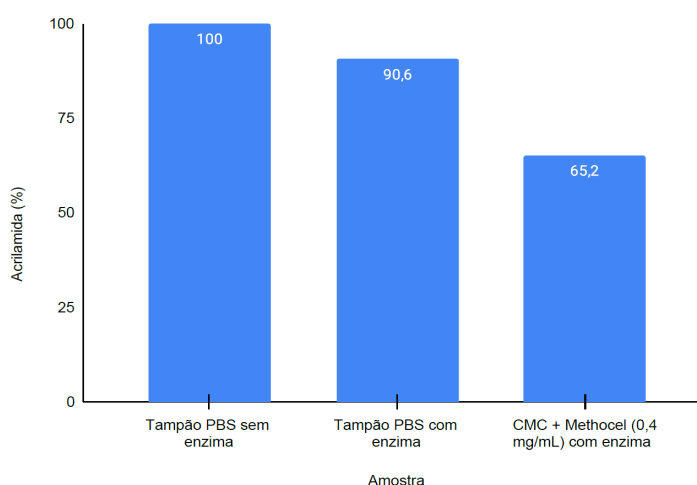
Com base nos resultados obtidos na avaliação da estabilidade térmica da L-asparaginase, foi possível identificar a formulação biopolimérica mais eficiente na preservação da atividade enzimática. Dentre as condições testadas, a formulação blend de CMC e Methocel (0,5 mg/mL) apresentou o melhor desempenho,

destacando-se pela maior estabilidade térmica e manutenção da atividade relativa da enzima. Dessa forma, essa formulação foi selecionada para os ensaios subsequentes de quantificação de acrilamida.

O experimento foi composto por três grupos distintos: o primeiro, contendo apenas o tampão PBS, sem enzima e sem biopolímeros, considerado o controle base correspondente a 100% da quantidade de acrilamida; o segundo, formado pela enzima livre em tampão (controle enzimático); e o terceiro, constituído pela enzima associada à formulação biopolimérica blend CMC + Methocel (0,5 mg/mL). As quantidades de acrilamida obtidas para os diferentes grupos foram expressas em porcentagem relativa em relação a esse controle base, permitindo a comparação direta entre os tratamentos. A hipótese proposta foi que a formulação biopolimérica, por apresentar maior estabilidade térmica e consequente atividade catalítica, resultaria em menores níveis de acrilamida após o tratamento térmico.

Após os procedimentos de extração da acrilamida dos grãos de café previamente torrados e submetidos aos diferentes tratamentos, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados das áreas dos picos cromatográficos, correspondentes à concentração relativa de acrilamida em cada amostra, encontram-se apresentados na Figura 6.

Figura 6 – Quantificação de acrilamida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em diferentes formulações enzimáticas com e sem biopolímeros



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os resultados obtidos na quantificação de acrilamida por HPLC confirmam a eficácia da formulação biopolimérica associada à L-asparaginase na redução da formação desse composto nos grãos de café. Observou-se que o grupo contendo a formulação enzimática com o blend de CMC e Methocel (0,5 mg/mL) apresentou a menor área de pico e, conseqüentemente, a menor porcentagem relativa de acrilamida ($\approx 65\%$) quando comparado ao controle, estabelecido como 100 %. Esses dados corroboram que o uso de biopolímeros contribui para aumentar a estabilidade térmica da enzima, permitindo que esta mantenha maior atividade catalítica sobre o substrato asparagina durante o processo térmico, o que leva à mitigação da formação de acrilamida.

Ainda que a redução tenha sido expressiva, nota-se que a formação de acrilamida não foi totalmente eliminada, o que pode estar relacionado à atividade enzimática (U/mL) empregada, sugerindo que ajustes na concentração da enzima ou no tempo e temperatura de tratamento poderiam potencializar o efeito redutor. De modo geral, verifica-se que a presença da enzima livre reduziu cerca de 10 % da formação de acrilamida, enquanto a formulação biopolimérica com o blend CMC + Methocel promoveu uma redução aproximada de 35 %, demonstrando ser uma estratégia eficiente, de baixo custo e promissora para aprimorar a atividade enzimática e minimizar a geração de acrilamida durante o processamento térmico de grãos de café.

4.3 Avaliação da Dureza e Adesão por texturômetro

A análise de adesão realizada por texturômetro não evidenciou diferenças significativas entre as amostras contendo a formulação biopolimérica e aquelas compostas apenas pelo tampão (PBS). Observou-se que, em ambas as condições, a viscosidade foi muito próxima à da água, o que impossibilitou a detecção de forças de adesão mensuráveis em Newton pelo equipamento utilizado. Esses resultados indicam que, na concentração de 0,5 mg/mL, os biopolímeros presentes na formulação não conferem alterações relevantes nas propriedades adesivas da amostra, não influenciando, portanto, na capacidade de aderência da solução enzimática à superfície do grão de café.

Por outro lado, os ensaios de dureza do grão de café revelaram diferenças notáveis entre os grupos avaliados. A medição foi baseada em duas variáveis: a força mínima, correspondente à intensidade necessária para causar deformação ou fissura superficial no grão, e a força máxima, representando a força requerida para a ruptura completa. A partir da comparação entre os três grupos, tampão PBS, tampão + enzima e tampão + enzima + biopolímeros (blend CMC + Methocel), foi possível observar variações consistentes nos valores médios de força. Conforme demonstrado na Tabela 4, os resultados obtidos indicam diferenças significativas de dureza entre os grupos.

Tabela 4 – Avaliação da Dureza dos grãos de Café torrados por texturômetro expressos em Força Mínima e Máxima para ruptura e rompimento total do grão de café respectivamente

Amostra	Força mínima (N)	Força máxima (N)
	Média	média
Tampão PBS sem enzima	8,9	15,40
Tampão PBS com enzima	4,16	18.76
CMC + Methocel (0,5 mg/mL) com enzima	6.05	35.6

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Como observado na Tabela 2, a resistência mecânica dos grãos tratados com a formulação biopolimérica contendo o blend de CMC e Methocel apresentou valores significativamente superiores de força (N) em comparação aos demais grupos, indicando um aumento expressivo na dureza do grão. Sugere-se, então, que a presença da enzima e, principalmente, da formulação biopolimérica, tenha influenciado diretamente na estrutura mecânica e na integridade física dos grãos após a torra. Essa modificação pode estar associada tanto à interação da enzima com os componentes estruturais do grão, como à formação de uma fina camada

polimérica sobre sua superfície, conferindo maior resistência à ruptura. Assim, o aumento da dureza observado pode refletir melhorias nas propriedades organolépticas e nas condições de armazenamento do grão, uma vez que grãos mais resistentes mecanicamente tendem a apresentar menor fragmentação e degradação durante o manuseio e estocagem (SOUZA, A. L. C. et al).

4.4 Sustentabilidade e potencial econômico/científico

Vários estudos demonstraram a eficácia de L-asparaginase na redução de acrilamida em diferentes alimentos. Em café torrado, o tratamento enzimático pré-torra reduziu a acrilamida em até 91% (XU, 2018). Em sistemas de batata frita, o tratamento com L-asparaginase de *Bacillus subtilis* resultou em redução superior a 80 % na formação de acrilamida nos chips fritos, em comparação com amostras não tratadas, demonstrando a eficácia da enzima como estratégia de mitigação em alimentos ricos em amido submetidos a altas temperaturas (ONISHI et al., 2015)

O desenvolvimento de formulações enzimáticas baseadas em biopolímeros aplicadas ao tratamento de grãos de café com L-asparaginase apresenta impacto significativo em diferentes dimensões. Do ponto de vista científico e técnico, a pesquisa contribui para o avanço no entendimento das interações entre biopolímeros e enzimas, oferecendo novas estratégias para aumentar a estabilidade e a eficiência catalítica de biocatalisadores. O caráter inovador do estudo reside na aplicação direcionada ao café, um alimento de grande relevância mundial, visando mitigar a formação de acrilamida, composto de reconhecido risco à saúde.

Sob a perspectiva econômica, a redução da acrilamida pode agregar valor ao produto final, fortalecendo a competitividade da cadeia produtiva do café brasileiro no mercado internacional. Do ponto de vista social e de saúde pública, a mitigação da exposição da população a esse contaminante reforça práticas alimentares mais seguras e alinhadas às recomendações de órgãos regulatórios.

No âmbito educacional e cultural, o trabalho contribui para a formação acadêmica e científica de estudantes e pesquisadores, além de valorizar um produto agrícola de destaque na cultura e economia do Brasil. A pesquisa também favorece a internacionalização, ao dialogar com desafios globais da indústria alimentícia e da biotecnologia, possibilitando colaborações internacionais.

Quanto à inserção local, regional e nacional, o projeto tem relevância para o estado de São Paulo, importante polo produtor e exportador de café, e para o Brasil, maior exportador mundial da commodity. Finalmente, ao utilizar biopolímeros de origem renovável e estratégias biotecnológicas, a proposta está em consonância com os princípios de desenvolvimento sustentável, unindo inovação científica, segurança alimentar e responsabilidade ambiental.

5 CONCLUSÃO

A presente pesquisa propôs o desenvolvimento e a avaliação de formulações à base de biopolímeros para o tratamento enzimático do grão de café com L-asparaginase, buscando mitigar a formação de acrilamida durante a torrefação tendo como propósito integrar princípios de biotecnologia, sustentabilidade e segurança alimentar, oferecendo uma alternativa inovadora e de baixo custo para o processamento de alimentos termicamente tratados.

Os resultados obtidos confirmaram a eficácia da estratégia proposta. As análises de estabilidade térmica demonstraram que a incorporação da L-asparaginase em biopolímeros, especialmente no blend de carboximetilcelulose (CMC) e metilcelulose (Methocel®), promoveu significativa melhora na termoestabilidade da enzima, preservando ou até ampliando sua atividade catalítica sob aquecimento moderado. Essa formulação se destacou entre as testadas, atingindo atividade relativa superior a 130% em relação ao controle, evidenciando um efeito sinérgico entre os dois polímeros.

A quantificação da acrilamida por HPLC revelou redução expressiva do composto nos grãos tratados com a formulação enzimática biopolimérica, atingindo cerca de 35% de diminuição em comparação ao controle. Esses dados comprovam que a melhoria da estabilidade da enzima impactou diretamente na sua eficiência catalítica, permitindo maior conversão da L-asparagina e, consequentemente, menor formação de acrilamida. Do ponto de vista prático, essa redução representa um avanço relevante na direção de processos alimentícios mais seguros e compatíveis com as exigências internacionais de qualidade e saúde pública.

Os testes mecânicos de dureza e adesão complementam a avaliação funcional das formulações, indicando que, embora a adesividade da solução biopolimérica não tenha sido alterada em relação ao tampão, houve aumento significativo da dureza dos grãos tratados. Tal comportamento sugere que a

presença do biopolímero e da enzima pode ter contribuído para a formação de uma camada protetora sobre o grão, conferindo maior resistência mecânica e potencialmente melhorando características organolépticas e de armazenamento.

Assim, os objetivos propostos foram alcançados, evidenciando o potencial dos biopolímeros derivados de celulose como matrizes eficientes para estabilização da L-asparaginase e aplicação direta no tratamento de alimentos. O estudo contribui cientificamente ao demonstrar uma abordagem sustentável e tecnicamente viável para mitigar a formação de acrilamida, unindo inovação biotecnológica e valorização de uma das principais commodities brasileiras. Do ponto de vista tecnológico, os resultados obtidos abrem caminho para o aperfeiçoamento de formulações enzimáticas aplicáveis em escala industrial, enquanto, sob a ótica social e econômica, reforçam o papel do Brasil na produção de alimentos mais seguros e de maior valor agregado.

Em síntese, esta pesquisa reafirma a importância da interface entre ciência e tecnologia no desenvolvimento de soluções sustentáveis, destacando a relevância dos biopolímeros como ferramentas promissoras na engenharia enzimática e no aprimoramento da qualidade dos produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

- ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F. Acrilamida: ocorrência em alimentos e formação durante o processamento térmico. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 231–244, 2008.
- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some industrial chemicals: acrylamide** (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 60). Lyon: WHO/IARC, 1994.
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Coffee report and outlook – December 2023**. London: ICO, 2023. Disponível em: https://icocoffee.org/documents/cy2023-24/Coffee_Report_and_Outlook_December_2023_ICO.pdf. Acesso em: 20 out. 2025.
- KIM, J. H. et al. Thermostabilization of L-asparaginase using cellulose-based biopolymers. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 6, p. 1556–1562, 2012.
- KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D.; SUBRAMANYA, S. B. A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 720–737, 2016. DOI: 10.3109/1040841X.2015.1022505.
- LANTZ, I. et al. Studies on acrylamide levels in roasting, storage and brewing of coffee. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 11, p. 1037–1046, 2006. DOI: 10.1002/mnfr.200600069.
- MEDEIROS, C. S. et al. Teores de acrilamida em cafés brasileiros e correlação com parâmetros de torrefação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 55–60, 2011.
- MICHALSKA, K.; JASKOLSKI, M. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 4, p. 627–640, 1 dez. 2006.
- MUHAMMAD, N. et al. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 241–258, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.115.
- MUNEER, F. et al. Microbial L-asparaginase: from production to therapeutic applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 170, 2019. DOI: 10.1186/s12934-019-1224-1.
- NERI, B. Acrilamida: formação em alimentos e riscos à saúde. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 17, n. 2, p. 107–118, 2004.
- ONISHI, Y. et al. Effective treatment for suppression of acrylamide formation in fried potato chips using L-asparaginase from *Bacillus subtilis*. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 783–789, 2015. DOI: 10.1007/s13205-015-0278-5.

PEDRESCHI, F. et al. Asparaginase treatment reduces acrylamide formation in fried and roasted coffee. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2738–2743, 2011. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.06.015.

PEDRESCHI, F. et al. Understanding acrylamide formation in coffee during roasting. **Food Chemistry**, v. 152, p. 444–450, 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.056.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013. DOI: 10.1039/C3CS60075K.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health implications of acrylamide in food**. Geneva: WHO, 2021. Disponível em: <https://www.who.int>. Acesso em: 09 jan. 2025.

XU, F. **Acrylamide mitigation in coffee by asparaginase application**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – University of Reading, Reading, 2018. DOI: 10.48683/1926.00084950.