

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

“HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS POLISSACARÍDEOS DO CAFÉ”

SÃO CARLOS, SP

29 DE AGOSTO DE 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

ILTON JOSÉ BARALDI

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS POLISSACARÍDEOS DO CAFÉ

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientação: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami.

Coorientação: Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano.

SÃO CARLOS

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B224he Baraldi, Ilton José.
Hidrólise enzimática dos polissacarídeos do café / Ilton José Baraldi. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
88 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Engenharia química. 2. Hidrólise enzimática. 3. Café solúvel. 4. Polissacarídeos. 5. Aroma. I. Título.

CDD: 660 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ILTON JOSÉ BARALDI**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 29 DE AGOSTO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:



Teresa Cristina Zangirolami
Orientadora / UFSCar



Raquel de Lima Camargo Giordano
Coorientadora / UFSCar



Alberto Colli Badino Junior
UFSCar



Josiane Alessandra Vignoli
UEL



Marcelo Caldeira Viegas
Café Iguaçu



Cristiane Sanchez Farinas
EMBRAPA



Úrsula Fabíola Rodríguez Zúñiga
UFSCar

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais José Carlos e Thereza, que sempre incentivaram os filhos a estudar, e sempre souberam da importância em adquirir e produzir conhecimento.

À minha noiva Rejane que sempre compreendeu minhas visitas restritas e esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis.

À *personal coaching* e amiga Iraceles Pires que despertou meu desejo em retornar à área acadêmica após passar tantos anos atuando na indústria.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha orientadora Teresa que sempre esteve disposta a orientar-me, acreditou em meu potencial, e ajudou-me a ter calma nos momentos que tive dificuldades. Conseguir concluir um trabalho ao mesmo tempo em que trabalhava na indústria, envolvido com muitas atividades paralelas, somente é possível com uma SUPER ORIENTADORA.

À minha coorientadora Raquel pelo apoio, sinceridade, amizade, auxílio, compreensão e pelo seu desejo de sempre transformar as pessoas.

Aos professores do PPG-EQ-UFSCar da área de concentração de engenharia bioquímica, pelos sólidos ensinamentos ministrados durante as aulas.

À Cia. Iguaçu de Café Solúvel que permitiu minha liberação em tempo parcial para executar os trabalhos e estudos na UFSCar.

Aos meus colegas de estudo na UFSCar que sempre auxiliaram, seja em compartilhar um artigo científico, ensinando-me a medir atividades enzimáticas ou compartilhando a amizade: Ana Maria, Anny, Claudia, Cristine, Diogo, Fernanda, Maurício, Mayerlenis, Mirella e Willian.

Aos meus colegas de trabalho na Cia. Iguaçu que me auxiliaram na execução dos experimentos, efetuaram análises e compartilharam conhecimento: Baptistella, Élcio, Ivan, Josiane, Lucas, Marcelo e Paulo.

Às Empresas Prozyn Biosolutions, Novozymes, Tovani Benzaquen, AB Enzymes e LNF Latino América pelas generosas doações de enzimas para a execução dos trabalhos.

A Deus que fez a natureza tão grandiosa para estudarmos.

RESUMO

O café solúvel é um dos principais produtos gerados pela indústria de alimentos mundial, consistindo na fração solubilizada do café torrado e moído por tratamento térmico em duas etapas: extração térmica a 125 °C, seguida por hidrólise térmica a 180 °C da fração não solubilizada na etapa anterior. Com elevado rendimento total (~ 50 %) na solubilização dos carboidratos presentes no café devido à alta temperatura empregada na etapa de hidrólise térmica, essa etapa se caracteriza por alto consumo de energia, além da geração de compostos voláteis indesejados (acetaldeído, furfural e 5-hidroxi metil furfural) provenientes da degradação térmica dos constituintes dos grãos de café. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de efetuar a hidrólise e solubilização dos polissacarídeos presentes no resíduo do café obtido após a etapa de extração térmica (baixa temperatura) por meio de hidrólise enzimática, além de comparar essa alternativa com o processo industrial convencionalmente empregado. Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados a 50 °C e pH 5,0, utilizando o resíduo de café arábica torrado obtido após extração térmica conduzida a 125 °C (Etapas I e II) ou a 165 °C (Etapa III). A fração solubilizada por extração térmica e pela hidrólise térmica ou enzimática foi caracterizada em termos de voláteis provenientes de degradação térmica por (GC-MS), composição de carboidratos (HPAEC-PAD) e avaliação sensorial. Na Etapa I do presente estudo, foram inicialmente testados 11 preparados enzimáticos comerciais apresentando atividades enzimáticas de galactomananases, celulases, galactanases e β -glucanases, dentre outras, capazes de atuar nos principais biopolímeros do café (arabinogalactanos - AGs, galactomananos - GMs e celulose), sendo selecionados os produtos Powercell, Galactomananase-HBI e Ultraflo[®] XL devido à maior atividade enzimática em substratos padronizados (463 FPU/g, 18.554 UI/g e 1.028 UI/mL, respectivamente). Na Etapa II, a influência da concentração dos preparados Powercell, Galactomananase-HBI e Ultraflo[®] XL (variáveis independentes) no desempenho do processo de hidrólise enzimática foi investigado por meio de 11 experimentos executados de acordo com um planejamento fatorial completo em dois níveis. Os resultados mostraram que o preparado Ultraflo[®] XL não contribuiu (p-valor > 0,49) para solubilização de carboidratos ou aumento de rendimento, enquanto que as enzimas presentes nos preparados Powercell e Galactomananase influenciaram significativamente as respostas, favorecendo a liberação de glicose, arabinose, galactose e manose como açúcares livres e totais (p-valor < 0,1). Os melhores resultados foram alcançados na condição experimental conduzida com 0,12 % de Powercell, 0,10 % de Galactomananase, e 0,12 % de Ultraflo[®] XL, alcançando-se 22,3 % de rendimento com reduzida concentração de voláteis indesejados. Os produtos obtidos pelos três processos foram ainda comparados, obtendo-se rendimentos semelhantes nas extrações térmica e hidrólise enzimática, enquanto o rendimento da hidrólise térmica foi aproximadamente 60% superior devido principalmente à maior solubilização de galactose, apresentando porém o dobro de voláteis indesejados. Buscando-se aumentar o rendimento do processo alternativo (extração térmica seguida por hidrólise enzimática), na Etapa III do estudo, a influência da temperatura de extração térmica foi variada de 125 a 175 °C. Os resultados mostraram que é possível elevar a temperatura da extração térmica até 165 °C, sem geração adicional de voláteis indesejados e com aumento de 80 % no rendimento desta etapa em relação ao processo tradicional realizado a 125 °C. O resíduo não solubilizado a 165 °C foi então processado por hidrólise térmica (180 °C) e hidrólise enzimática em 3 diferentes condições experimentais avaliadas no planejamento fatorial realizado na Etapa II. Os rendimentos alcançados foram semelhantes para a hidrólise térmica e hidrólise enzimática (~28 %), constatando-se que o aumento da temperatura da extração térmica favoreceu a solubilização dos biopolímeros do café pela ação das enzimas, novamente com reduzida formação de voláteis indesejados. Efetuou-se avaliação sensorial dos cafés solúveis obtidos, sendo que os produtos gerados a 125 e 165 °C apresentaram características semelhantes ao café de coador. Já o hidrolisado obtido termicamente nas Etapas II e III se destacou pela elevada acidez, enquanto o hidrolisado enzimático gerado na Etapa II apresentou característica fortemente amarga e o da Etapa III característica neutra, mostrando que embora necessite ser aprimorada, a hidrólise enzimática pode ser utilizada na fabricação de café solúvel.

Palavras Chaves: Café Solúvel, Carboidratos do Café, Hidrólise Enzimática, Hidrólise Térmica

ABSTRACT

Instant coffee is one of the main products generated by food industry worldwide, consisting of solubilized fraction from roasted and grounded coffee by heat treatment in two steps: thermal extraction at 125 °C, followed by thermal hydrolysis at 180 °C of not solubilized fraction in the previous step. With a high overall yield (~ 50%) due to high temperatures used in thermal hydrolysis step in order to solubilize carbohydrates present in the coffee, this step is characterized by high energy consumption and generation of unwished volatile compounds (acetaldehyde, furfural and 5-hydroxy methyl furfural) from thermal degradation of coffee beans constituents. The goal of this study was to evaluate the feasibility of conducting hydrolysis and solubilization of polysaccharides remaining in coffee residue after thermal extraction step (low temperature) through enzymatic hydrolysis. This alternative was further compared to the industrial process conventionally employed. Enzymatic hydrolysis experiments were performed at 50 °C and pH 5.0, using roasted arabica coffee residue obtained after thermal extraction conducted at 125 °C (Steps I and II) or at 165 °C (Step III). Solubilized fraction by thermal extraction, thermal or enzymatic hydrolysis were characterized in terms of volatiles from thermal degradation (GC-MS), carbohydrate composition (HPAEC-PAD) and sensorial evaluation. In Step I of this study, 11 commercial enzyme preparations, presenting enzymatic activities of galactomannanases, cellulases, galactanases and β -glucanases, among others, able to act in coffee biopolymers (arabinogalactans - AGs, galactomannans - GMs and cellulose) were tested. Three enzyme preparations (Powercell, Galactomannanase-HBI and Ultraflo[®] XL) were selected due to their high activity in standard substrates (463 FPU / g, 18,554 IU / g and 1.028 IU / mL, respectively). In Step II, the influence of the concentration of enzymatic preparations Powercell, Galactomannanase-HBI and Ultraflo[®] XL (independent variables) on the performance of the enzymatic process was investigated by running 11 experiments performed according to a full factorial design in two levels. Results showed that Ultraflo[®] XL preparation did not contribute for carbohydrates solubilization nor for yield increasing (p-value > 0.49), while enzymes present in the preparations Galactomannanase and Powercell influenced significantly the response variables favoring the release of glucose, arabinose, mannose and galactose as free and total sugars (p-value < 0.1). The best results were achieved in the experimental condition conducted with 0.12% of Powercell, 0.10% of galactomannanase, and 0.12% of Ultraflo[®] XL, reaching up 22.3% of yield with reduced concentration of unwished volatiles. Products obtained by the three processes were also compared, resulting in similar yields for thermal extraction and enzymatic hydrolysis, whereas thermal hydrolysis yield was approximately 60% higher, due to a high solubilization of galactose. However, this product contained double concentrations of unwished volatiles compounds. In order to improve the yield of the alternative process (thermal extraction followed by enzymatic hydrolysis), in Step III the extraction temperature influence in a range of 125 to 175 °C was studied. Results showed that it is possible to increase thermal extraction temperature to 165 °C, without additional generation of unwished volatiles and with 80% increase of yield in this stage, when compared to the traditional process performed at 125 °C. Residue unsolubilized at 165 °C was then processed by thermal hydrolysis (180 °C) and enzymatic hydrolysis in 3 different experimental conditions of factorial design performed in Step II. Achieved yields were similar in thermal and enzymatic hydrolysis (~ 28%). It was also noticed that increase of thermal extraction temperature enhanced coffee biopolymers solubilization by the enzymes action, again with reduced formation of undesirable volatiles. Sensorial evaluation of soluble coffees obtained by the different process was conducted. Product generated at 125 and 165 °C showed characteristics similar to roasted and grinded coffee fresh brew. Yet, thermal hydrolyzed products in Stages II and III stood out by high acidity, while the enzymatic hydrolyzed product showed characteristic strongly bitter in Step II and neutral characteristic in Stage III, although enzymatic hydrolysis can be improved it can be used for instant coffee production.

Key Words: Instant Coffee, Coffee Carbohydrates, Enzymatic Hydrolysis, Thermal Hydrolysis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1- Processos de Fabricação de Café Solúvel	4
2.2 – Tecnologias Enzimáticas no Processamento do Café	12
2.2.1 – Aplicações Gerais de Enzimas em Café Cru (Verde).....	12
2.2.2 – Utilização de Enzimas na Biotransformação de Compostos Específicos do Café	14
2.2.3- Produção de Compostos com Aplicações Farmacêuticas ou em Cosméticos	15
2.2.4 – Hidrólises dos Polissacarídeos do Café	15
3. Análise Comparativa de Hidrólise Térmica e Enzimática do Resíduo da Extração do Café Torrado	18
3.1 - INTRODUÇÃO	20
3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.2.1 - Materiais	23
3.2.2 - Métodos Analíticos	23
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.4 - CONCLUSÕES	36
3.5 – AGRADECIMENTOS	37
3.6 - REFERÊNCIAS.....	37
4 - Produção de Café Solúvel auxiliada por Enzimas.....	40
4.1. INTRODUÇÃO	40
4.2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.2.1 - Materiais.....	44
4.2.2 - Procedimento experimental	44
4.2.3 – Métodos Analíticos	46
4.2.4 - Procedimentos de Cálculo.....	47
4.2.5 - Análise Estatística do Planejamento Fatorial	48
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
4.3.1 - Avaliação da ação dos diferentes preparados enzimáticos na hidrólise dos polissacarídeos do café	49
4.3.2 - Avaliação do desempenho dos processos de extração, hidrólise térmica e enzimática.	52
4.3.3 - Caracterização dos produtos EA, CHT e CHE	54
4.3.3 - Análise sensorial dos produtos EA, CHT e CHE.....	56
4.4 - CONCLUSÕES	58
4.5 - REFERÊNCIAS:.....	59

5	– Combinação de Processo Térmico e Enzimático na Extração de Café Solúvel.	62
5.1	– INTRODUÇÃO	62
5.2	- MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
5.2.1	- Materiais:.....	64
5.2.2	- Procedimentos Experimentais	65
5.2.3	– Métodos analíticos.....	67
5.2.4	– Procedimentos de Cálculo	69
5.3	- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	70
5.3.1	– Determinação da temperatura ótima de extração	70
5.3.2	– Comparações de rendimento, açúcares totais e voláteis entre as etapas extração térmica, hidrólise térmica e hidrólise enzimática.....	70
5.3.3	– Recuperação Global e de Carboidratos	73
5.3.4	– Massas Moleculares	75
5.3.5	– Composições de Aminoácidos	78
5.3.6	– Avaliação Sensorial	79
5.3.7	– Estimativas de Custo do Processo Enzimático	80
5.4	– CONCLUSÕES.....	81
5.5	- REFERÊNCIAS.....	82
6	– CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES.....	84
7	- REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	86

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Produção mundial e exportação de café	1
Tabela 1.2: Importação e reexportação mundial de café.....	1
Tabela 3.1: Atividades em celulases nos 3 preparados enzimáticos celulolíticos (por g ou mL dos preparados enzimáticos comerciais).	29
Tabela 3.2: Atividades em galactomananases, β -glucanases e galactanases avaliadas em 8 preparados enzimáticos comerciais.	29
Tabela 3.3: Concentração em açúcares livres do extrato aromático (EA) e dos produtos obtidos por hidrólise térmica (CHT) e enzimática (CHE).	30
Tabela 3.4: Concentração em açúcares totais para o extrato aromático (EA) e os produtos obtidos por hidrólise térmica (CHT) e enzimática (CHE).	31
Tabela 3.5: Concentração de açúcares não livres para o extrato aromático (EA) e os produtos obtidos por hidrólise térmica (CHT) e enzimática (CHE).....	32
Tabela 3.6: Rendimentos das etapas Extração, Hidrólise Térmica e Hidrólise Enzimática, calculados pelas Eq. 1 e 2.	32
Tabela 3.7: Concentração de voláteis, em ppb, no extrato aromático (EA) e nos produtos obtidos por hidrólise térmica (CHT) e enzimática (CHE).	33
Tabela 4.1: Níveis empregados no planejamento experimental e concentração correspondente das enzimas (g enzima / g substrato).	46
Tabela 4.2: Padrões de referência utilizados em análise	47
Tabela 4.3: Concentrações de preparados enzimáticos (em fração mássica) empregados nos ensaios de hidrólise enzimática e resultados obtidos em termos de rendimento (R) e composição dos hidrolisados obtidos em açúcares livres e totais (% m/m).	50
Tabela 4.4: Rendimentos dos processos de extração, hidrólise térmica e enzimática.....	51
Tabela 4.5: Recuperação calculada a partir balanço global para os sólidos.....	53
Tabela 4.6: Composição (açúcares totais) em carboidratos dos materiais sólidos	53
Tabela 4.7: Composição (açúcares totais) em carboidratos dos produtos EA, CHT e CHE .	53
Tabela 4.8: Recuperação para os açúcares arabinose, galactose, glicose e manose calculada a partir balanço por componente e balanço para os carboidratos totais.....	54
Tabela 4.9: Composição (açúcares livres) em carboidratos dos produtos EA, CHT e CHE..	55

Tabela 4.10: Composição de voláteis dos cafés solúveis obtidos pelos diferentes processos.	56
Tabela 4.11: Resultados das análises sensoriais para os produtos EA, CHT e CHE.....	57
Tabela 5.1: Experimentos de Hidrólise Enzimática do RE	67
Tabela 5.2 – Gradiente de eluentes para análise de aminoácidos por HPLC-PAD	68
Tabela 5.3: Composição em carboidratos totais em (% m/m) e furfural (ppb) obtidos nas diversas temperaturas de extração ou hidrólise térmica.....	70
Tabela 5.4: Rendimento, açúcares totais e voláteis dos extratos EA, CHT e CHE.....	71
Tabela 5.5: Recuperação calculada à partir do balanço global de sólidos	73
Tabela 5.6: Composição de lipídeos e açúcares em CT, RE, RHT e RHE	74
Tabela 5.7: Recuperação de carboidratos para os açúcares arabinose, galactose, glicose, manose e açúcares totais.	75
Tabela 5.8: Dados viscosimétricos do EA em função da concentração de sólidos solúveis (C)	75
Tabela 5.9: Dados viscosimétricos do CHT em função da concentração de sólidos solúveis (C).....	76
Tabela 5.10: Dados viscosimétricos do CHE (ponto 8) em função da concentração de sólidos solúveis (C).....	76
Tabela 5.11: Massas moleculares calculadas pela equação 5.1	77
Tabela 5.12: Quantificação de aminoácidos em CT, RE, RHT, RHE, EA, CHT e CHE.	78
Tabela 5.13: Resultado das avaliações sensoriais para os produtos EA, CHT e CHE.	79
Tabela 5.14 – Custos dos adicionais do processo enzimático: Base de cálculo 100 kg de RE	80

Lista de Figuras

Figura 2-1: Café Arábica e Conilon	4
Figura 2-2: Grãos chatos (P10 até P19) e grãos moca (Mk08 a Mk12).....	5
Figura 2-3: Principais defeitos do café e amostras com total de 4 e 2.100 defeitos.	6
Figura 2-4: Torrador Gothot [®] (SIVETZ; DESROSIER, 1979).....	7
Figura 2-5: Microscopia eletrônica de varredura – Café arábica torrado a 220 °C (GUTIERREZ et al., 1993).	8
Figura 2-6: Sistema extração IC/FIC [™] (GEA-NIRO, 2013).....	9
Figura 2-7: Coluna operada sob vácuo SCC [®] - (Flavourtech - Spinning Cone Column, 2013)	10
Figura 2-8: Interface de separação cristais de gelo e extrato de café (Freeze Concentration - GEA, 2013).....	10
Figura 2-9: a) café solúvel Spray Dried e b) Café Solúvel Liofilizado	11
Figura 2-10: Fluxograma de produção de café solúvel (SIVETZ; DESROSIER, 1979).....	11
Figura 2-11: Resultado de pesquisa em banco de Patentes de 2001 a 2013 com palavras chaves “COFFEE” e “ENZYME” (www.isiknowledge.com, base de dados <i>Derwent Innovation Index</i> [®]).....	15
Figura 3-1: Estrutura de GM mostrando a ligação α -1,6 hidrolisada pela α -galactosidase, a ligação β -1,4 no interior da cadeia hidrolisada pela β -mananase e a ligação β -1,4 não redutora hidrolisada pela β -manosidase.; <i>p</i> : piranose (MAHAMMAD et al., 2007).	22
Figura 3-2: Fluxograma de obtenção de café solúvel pelos processos de extração, hidrólise térmica e enzimática.	26
Figura 3-3: Produção de açúcares redutores com o tempo durante hidrólise enzimática realizada a 50 °C, pH 5,0, pelo <i>pool</i> de preparados enzimáticos comerciais Powercell, Galactomananase HBI Enzymes e Ultraflo [®] XL.	34
Figura 4-1: Estrutura simplificada dos AGs	42
Figura 4-2: Estrutura simplificada dos GMS	42
Figura 4-3: Fluxograma de obtenção de café solúvel pelos processos de extração, hidrólise térmica e enzimática.	45
Figura 4-4: Preparados enzimáticos e influência na produção de açúcares e rendimento das hidrólises. a) Efeitos do preparado Powercell na produção de açúcares livres; b) Efeitos do	

preparado Galactomananase na produção de açúcares livres; c) Efeitos dos diferentes preparados enzimáticos no rendimento (Equação 4.3); d) Efeitos dos preparados enzimáticos Powercell e Galatomananase na produção de oligossacarídeos contendo glicose e manose como açúcares totais (A.T.). Barras representam o erro associado à estimativa dos efeitos. I.C. – 95%.	52
Figura 5-1: Reatores Enzimáticos Trabalhando em Paralelo.....	66
Figura 5-2: Regressão linear dos dados da Tabela 5.8 (EA)	76
Figura 5-3: Regressão linear dos dados da Tabela 5.9 (CHT)	77
Figura 5-4: Regressão linear dos dados da Tabela 5.10 (CHE – Ponto 8).....	77
Figura 5-5: Cafés do EA, CHT e CHE antes e após a adição de água (amostras para avaliação sensorial)	79

Lista de Abreviações

AGs – Arabinogalactanos

CHE – Café Hidrólise Enzimática

CHT – Café Hidrólise Térmica

CT – Café Torrado

EA – Extrato Aromático

GMs – Galactomananos

HS-SPME-GC-MS – Head Space – Solid Phase Micro Extraction – Gas Chromatography – Mass Spectrum detection

HPAEC-PAD – *High Performance Anion Exchange Chromatography – Pulsed Amperometric Detection*

m_{CT} – Massa de Café Torrado

m_{EA} – Massa de Extrato Aromático

m_L – Massa Liofilizada

m_{ss} - Massa de Sólidos Solúveis

R - Rendimento

RE – Resíduo da Extração

RE_{fino} – Resíduo de Extração moído em granulometria fina

Rec – Recuperação em massa total ou de um componente

RHE – Resíduo da Hidrólise Enzimática

RHT – Resíduo da Hidrólise Térmica

x_{EA} – Fração mássica de sólidos solúveis no extrato aromático

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo responsável por 35,28% da produção com 144 milhões de sacas (60 kg) na safra de 2012/13, sendo também o principal país exportador desta *commodity* agrícola (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Produção mundial e exportação de café

PAISES	Produção – Safra 2012/13 (1.000 Sacas 60 kg)	Exportação – Ano 2011 (1.000 Sacas 60 kg)
Brasil	50.826	30.826
Vietnã	22.000	20.417
Indonésia	10.950	7.283
Colômbia	8.000	6.561
Etiópia	6.500	3.117

Fonte: (ICO, 2013)

Os principais mercados importadores são os Estados Unidos, Alemanha e Itália. Esses países, além de consumirem o café internamente, também manufacturam a matéria-prima e reexportam produtos industrializados de maior valor agregado, sendo os principais beneficiados desta cadeia produtiva (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Importação e reexportação mundial de café

PAÍS	Importação – Ano 2011 (1.000 Sacas de 60 kg)	Reexportação – Ano 2011 (1.000 Sacas de 60 kg)
EUA	26.093	3.728
Alemanha	20.926	11.683
Itália	8.326	2.669
Japão	7.544	80
França	6.992	1.043

Fonte: (ICO, 2013)

Um dos fatores que contribui para o sucesso dos países desenvolvidos no processamento e reexportação de café é o desenvolvimento de produtos inovadores que utilizam café como ingrediente, assim como o desenvolvimento de tecnologias eficientes para o seu processamento. Faz-se, portanto, necessário que os países produtores aumentem os investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D) para se transformarem de exportadores de matéria-prima a exportadores de produtos manufacturados (FURTADO, 2011).

Dentre os produtos industrializados obtidos a partir do processamento do café, destacam-se café torrado e moído (embalagens almofada, sachês, cápsulas de alumínio, etc), café solúvel e bebidas instantâneas com o ingrediente café (cappuccinos, café com

leite, café com chocolate, etc), sendo o café solúvel o principal derivado, onde a produção nacional foi de 79,2 mil ton. em 2012 (SOUZA et al., 2013). O consagrado processo GEA-NIRO (2013) domina a produção industrial de café solúvel desde o início da década de 1980. Nesse processo, grãos de café torrados e moídos são submetidos a tratamento térmico composto basicamente por duas etapas sequenciais: extração e hidrólise. Na extração térmica, os polissacarídeos e outros compostos solúveis presentes na matéria-prima são extraídos com água a 125 °C, obtendo-se a fração denominada “extrato aromático”, de excelente qualidade em termos de sabor e aroma. Porém, devido ao baixo rendimento (~ 20%), a obtenção de um produto com preço acessível depende da etapa de hidrólise térmica, na qual o resíduo da etapa de extração térmica é tratado com água a 180 °C, sob alta pressão, tendo como principais características a alta eficiência na geração de polissacarídeos solúveis e o elevado rendimento (~28 %). Em contrapartida, o uso da alta temperatura torna esse processo industrial dependente de intenso consumo energético, além de comprometer a qualidade do produto final, devido à formação de compostos indesejáveis (acetaldeído, furfural e 5-hidroxi-metil-furfural) provenientes da degradação térmica dos constituintes do café (DE MARIA, 1994).

Considerando a tendência atual de adoção de processos industriais de menor impacto energético e ambiental, o principal objetivo do presente trabalho foi estudar tecnologias alternativas que permitam a solubilização dos polissacarídeos constituintes do grão de café, no processo de produção de café solúvel, visando um produto de maior qualidade, isento de compostos de degradação e sem prejuízo ao rendimento do processo.

Assim, para efeito de apresentação das atividades desenvolvidas e dos resultados obtidos no trabalho, optou-se pela redação da tese de acordo com a seguinte estrutura:

- Capítulo 2: Revisão sobre os processos de fabricação de café solúvel e principais aplicações de tecnologia enzimática no processamento de café, com maior ênfase na hidrólise enzimática dos polissacarídeos do café.
- Capítulo 3: Caracterização de 11 preparados enzimáticos comerciais em termos de atividades em celulasas, galactomananases, galactanases e β -glucanases, assim como avaliação dos 3 preparados selecionados na hidrólise dos polissacarídeos do café. Comparou-se ainda a fração solubilizada obtida pelo tratamento enzimático com as correspondentes geradas no processo convencional (etapas de extração e hidrólise térmica) em termos de composição de carboidratos, compostos voláteis e rendimento. O conteúdo deste capítulo foi submetido como artigo ao periódico *Coffee Science*.
- Capítulo 4: Avaliação da contribuição de cada preparado enzimático selecionado em termos de rendimento, liberação de polissacarídeos solúveis e composição em açúcares

livres e totais dos mesmos utilizando planejamento fatorial completo. Parte do conteúdo integrará artigo a ser submetido ao periódico *International Journal of Food Science and Technology*, juntamente com parte da revisão apresentada no Capítulo 2.

- Capítulo 5: Mapeamento da influência da temperatura da etapa de extração térmica nas características do extrato aromático produzido, visando identificar a temperatura de operação dessa etapa preliminar de obtenção do café solúvel que favoreça sua integração com o processo de hidrólise enzimática, potencializando a ação das enzimas no resíduo proveniente da etapa de extração térmica, sem comprometimento da qualidade do produto (extrato aromático) por subprodutos de degradação.

- Capítulo 6: Considerações finais e recomendações para aplicação da tecnologia enzimática na solubilização dos biopolímeros constituintes do café.

As referências adicionais estão no final do trabalho, por terem sido citadas nos capítulos 1, 2 e 6 que não foram escritos em formato de artigo científico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Processos de Fabricação de Café Solúvel

O café solúvel foi inventado pelo químico japonês Satori Kato no ano de 1901 em Chicago-EUA, e seu processo de produção em larga escala foi implementado em 1906 pelo químico inglês George Constant Washington. No ano de 1938 uma empresa suíça lançou o café solúvel liofilizado, que fez parte de um plano do governo brasileiro para resolver o excesso de oferta de matéria-prima no mercado. Mas somente após a Segunda Guerra Mundial esse produto se popularizou no mercado (BELLIS, 2013).

Para a produção de café solúvel é importante selecionar matérias-primas padronizadas, cuja classificação foi regulamentada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), onde se estabeleceu que o café cru (verde) será classificado em categoria, subcategoria, grupo, classe e tipo, da seguinte forma (MAPA, 2003):

- a) Categoria: Tipo I – Café arábica (*Coffea arabica*), Tipo II – Café Conilon (*Coffea canephora*), apresentados na Figura 2-1.



Figura 2-1: Café Arábica e Conilon

O café arábica corresponde a 70% da produção mundial, sendo considerado uma bebida mais nobre devido aos aromas e sabores que se desenvolvem durante a torra. Contém aproximadamente 1,4% de cafeína e é cultivado em altitudes de 600 a 2000 metros acima do nível do mar. Essa variedade exige cuidados especiais intensos desde o cultivo até a colheita, tendo como média histórica preço 50%

superior ao café conilon. No Brasil, ele é cultivado principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná (FERNANDES et al., 2003).

O café conilon é mais rústico, suportando deficiências hídricas, sendo mais resistente ao ataque de pragas. Possui aproximadamente 2,5% de cafeína, sabor mais amargo e desenvolve menos compostos aromáticos durante a torra. Essa variedade é cultivada desde o nível do mar até altitude de 600 metros, tendo os estados de Rondônia e Espírito Santo como os principais produtores. Apesar de ser considerado de qualidade inferior ao arábica, o aprimoramento nos tratos culturais também proporcionou ganho significativo de qualidades nesta variedade, sendo comum a elaboração de produtos com *blends* de café conilon e arábica (FERNANDES et al., 2003).

- b) Subcategoria: Classificado de acordo com a forma em grão chato (superfície plano-convexa) ou moça (forma de ovo), e de acordo com o tamanho em gráudo (peneiras 17, 18 e 19), médio (peneiras 15 e 16) e miúdo (peneira 14 e inferiores), onde o número da peneira corresponde a um múltiplo de 1/64 polegadas, ou seja, peneira 17 corresponde à abertura de 17/64 polegadas. As formas e tamanhos são apresentados na Figura 2-2.

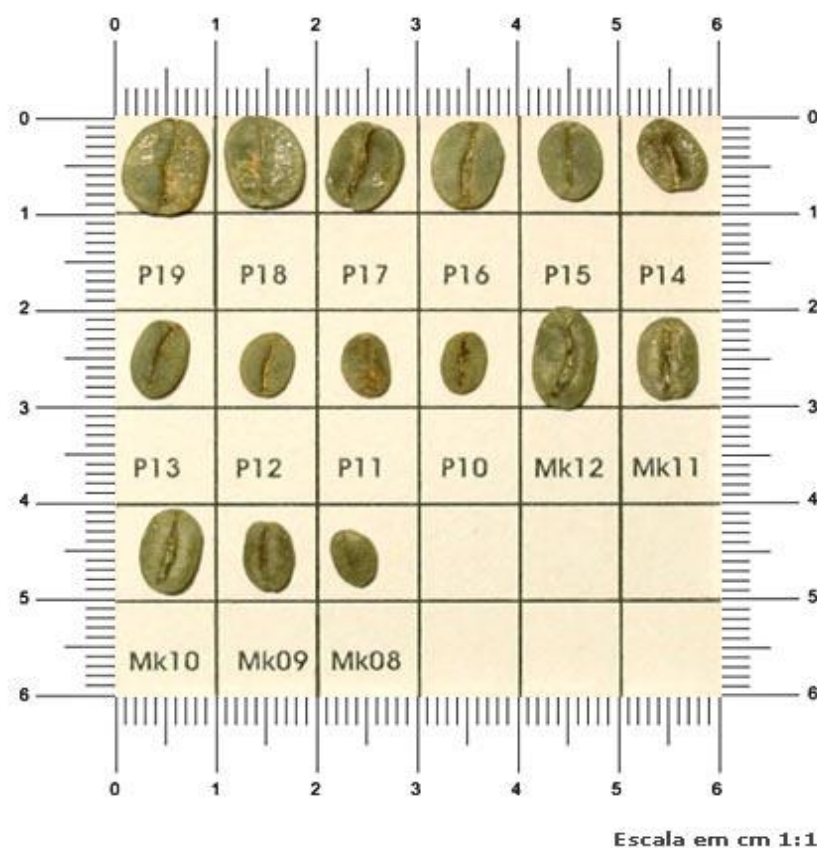


Figura 2-2: Grãos chatos (P10 até P19) e grãos moça (Mk08 a Mk12). Números correspondem às peneiras.

c) Grupo: Classificação do café baseada em seu aroma e sabor, sendo:

Grupo I: Bebida arábica, que tem sabor mais acentuado, aromático e menor quantidade de cafeína que o conilon, classificada em bebida fina (estritamente mole, mole, apenas mole e dura) e bebida fenicada (riado, rio e riozona).

Grupo II: Bebida Robusta, que tem sabor e aromas neutros, tendendo para o amargo, subdividida em excelente, boa e normal.

d) Classe: O café cru é classificado de acordo com sua coloração em verde azulado, verde, amarelado, amarelo, marrom, chumbado e discrepante.

e) Tipo: Classificação baseada nos defeitos do grão de café e nas impurezas presentes em amostra de 300 g, indo do tipo 2 (máximo de 4 defeitos) até tipo 8 (máximo de 360 defeitos). Os principais defeitos encontrados no café estão na Figura 2-3.



Figura 2-3: Principais defeitos do café e amostras com total de 4 e 2.100 defeitos.

Para a elaboração do café solúvel, inicia-se com um “blend” de matéria-prima devidamente padronizada (classificada), seguida pela etapa de torra. Normalmente a torra é conduzida em equipamentos operando em batelada, onde os gases da fornalha (temperatura ao redor de 650 °C) entram em contato com o café cru, promovendo inicialmente um processo de secagem, seguido por centenas de reações químicas complexas, onde os aromas (mais de 800 voláteis foram detectados) e coloração do café são desenvolvidos. Quando os grãos torrados atingem uma temperatura de aproximadamente 230 °C (dependendo do grau de torra desejado), a torra é interrompida com o corte do fluxo de ar quente. Em seguida, é adicionada água de resfriamento dentro da câmara de torra, o café torrado é descarregado e resfriado com fluxo de ar à temperatura ambiente (SIVETZ; DESROSIER, 1979).

Na Figura 2-4 temos o esquema de funcionamento de um torrador batelada, modelo Gothot[®], com as setas indicando o fluxo de café, ar quente e ar de resfriamento.

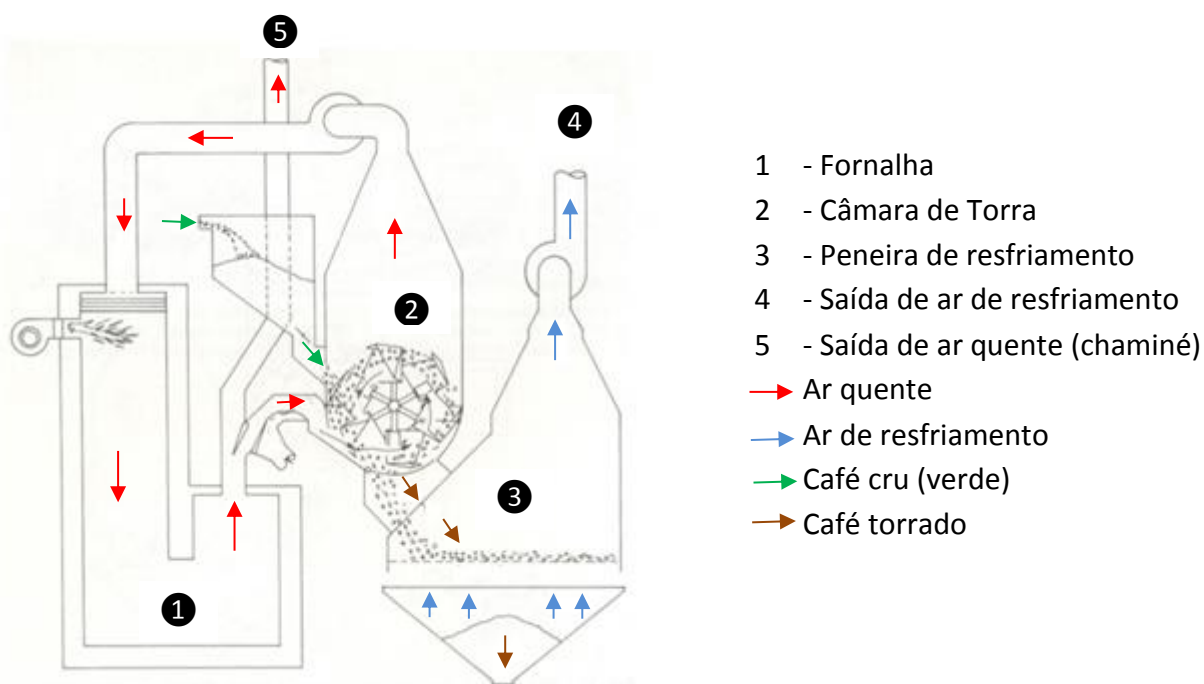


Figura 2-4: Torrador Gothot[®] (SIVETZ; DESROSIER, 1979)

Os grãos de café sofrem expansão durante a torra, tornando-se mais porosos como efeito da liberação de gases durante reações de pirólises, onde se destaca o CO₂. O café arábica torrado até 220 °C tem porosidade de 43% (volume de vazios/volume total) e poros entre 12 e 26 μm de diâmetro, cujas medidas foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura (Figura 2-5), (GUTIERREZ et al., 1993).

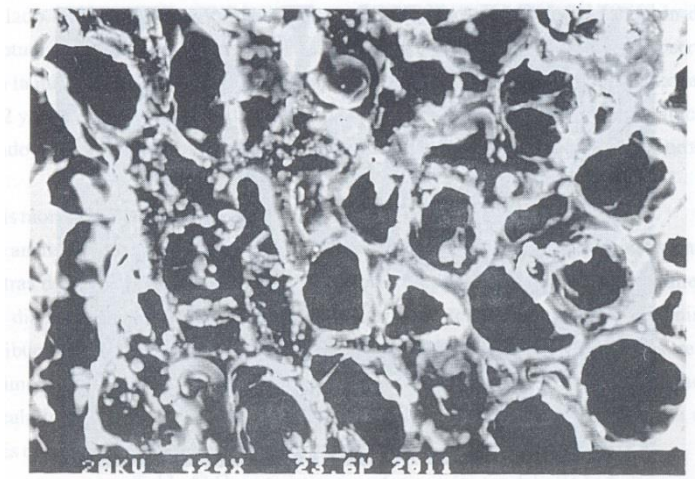


Figura 2-5: Microscopia eletrônica de varredura – Café arábica torrado a 220 °C (GUTIERREZ et al., 1993).

Kasai et al. (2006) efetuaram digestão de grãos de café torrado fatiados em quatro etapas consecutivas como descrito abaixo, com o objetivo de determinar a estrutura da parede celular:

- a) Extração com Na_2CO_3 0,1M a 98°C por 20 minutos: 54,4% da massa de café torrado foram solubilizadas, sendo a composição (mol%) do solubilizado 45,0% de galactose, 25,2% de manose, 15,4% de arabinose e 14,4% de glicose.
- b) Do resíduo insolúvel da extração com Na_2CO_3 efetuou-se extração com celulase a 40 °C em pH 5,0 por aproximadamente 18 horas: 25,1% da massa inicial de café torrado (item a) de café foi solubilizada, sendo a composição (mol%) do solubilizado 55,0% de manose, 30,9% de glicose, 7,9% de galactose e 6,3% de arabinose.
- c) Do resíduo da segunda extração (celulase) efetuou-se extração com NaOH 0,1M à 121 °C por 20 minutos: 10,0 % da massa inicial de café (item a) foi solubilizada, sendo a composição (mol%) do solubilizado 72,2% de galactose e 27,8% de manose, sem detecção de arabinose e glicose.
- d) Do resíduo da terceira extração (NaOH), repetiu-se a processo do item b: 6,6% da massa inicial de café (item a) foi solubilizada, sendo a composição (mol%) do solubilizado 43,3% de manose, 33,1% de glicose, 13,5% de galactose e 10,1% de arabinose.

Com este ensaio Kasai et al. (2006) mostraram que os carboidratos existentes no grão de café, embora em composições variadas, se distribuem ao longo de toda a parede celular. A arabinose mesmo sendo removida em grande quantidade na primeira de extração (a), ainda está presente no material solubilizado no item (d), e essa distribuição dos carboidratos é importante para compreender os processos de extração e hidrólise.

Após a torra, os grãos de café são granulados em moinhos com rolos estriados para produzir partículas inferiores a 4,0 mm, que são introduzidas em colunas percoladoras (7 colunas de percolação em série), onde o café granulado fica compactado em leitos fixos, e extraídas em contracorrente com água quente. O processo comercialmente existente (GEA-NIRO, 2013) permite que a primeira extração com água seja realizada em temperatura mais baixa (125 °C). Neste caso, o extrato de café produzido é chamado de extrato aromático (EA). A partir do material não solubilizado efetua-se uma segunda extração em temperatura mais elevada (180 °C) e o extrato de café produzido é chamado de hidrólise térmica (CHT), conforme ilustra a Figura 2-6.

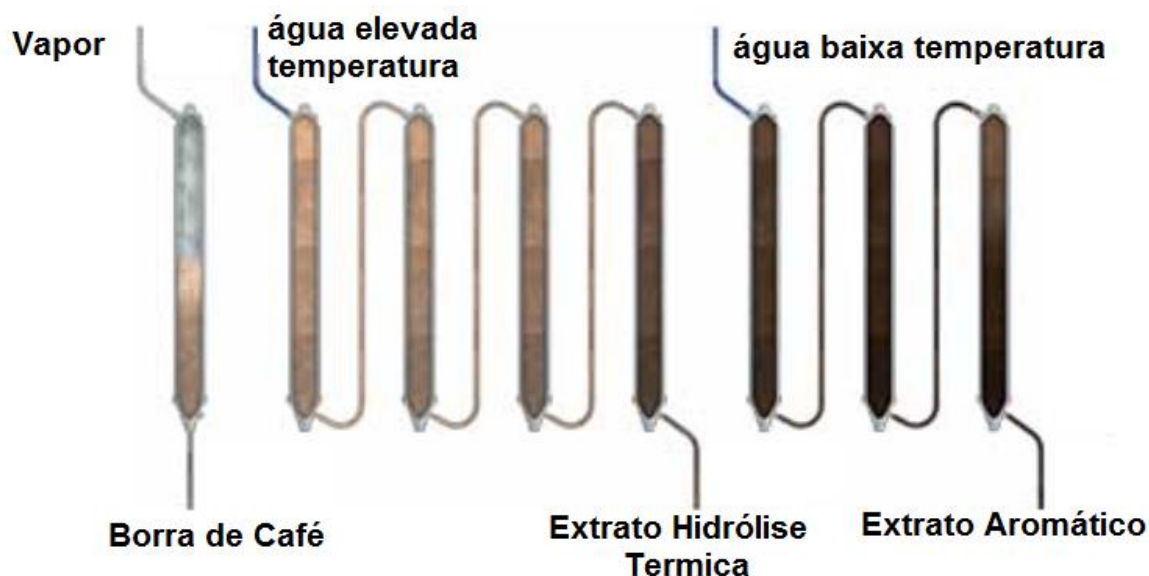


Figura 2-6: Sistema extração IC/FIC™ (GEA-NIRO, 2013).

Deve-se ressaltar que as colunas extratoras são dotadas de filtro na saída, e caso ocorra o arraste de insolúveis no extrato de café, estes são removidos por filtração e/ou centrifugação.

Após a extração, os extratos de café bruto (4,0 a 18,0 % m/m), são concentrados pelas tecnologias atualmente existentes para o processamento de suco de frutas, utilizando: evaporadores (concentração térmica) e crio concentradores (concentração à baixa

temperatura), obtendo-se o extrato de café concentrado normalmente acima de 40% (m/m) (SIVETZ; DESROSIER, 1979).

O extrato aromático (EA), que normalmente apresenta características semelhantes ao café tradicional (coador), deve ser concentrado por tecnologias que preservam os compostos voláteis presentes, que estão associados à qualidade superior do produto. Os aromas podem ser separados por *stripping* ou destilação com vapor em uma coluna operada sob vácuo (Figura 2-7) e incorporados no extrato após concentração por evaporação.

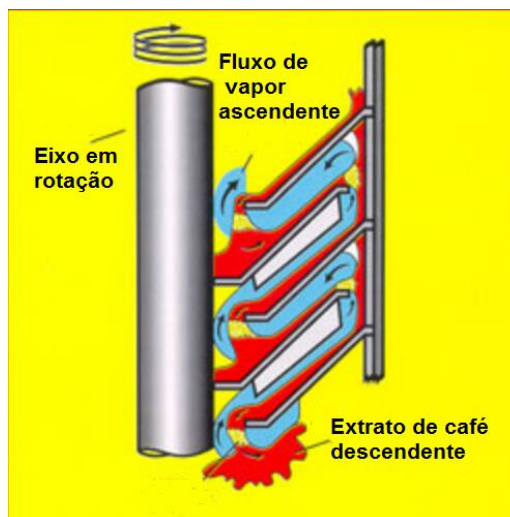


Figura 2-7: Coluna operada sob vácuo SCC[®] - (Flavourtech - Spinning Cone Column, 2013)

Outra forma de preservar os aromas do EA é utilizar a crio concentração. Neste processo, parte da água é congelada e separada do extrato de café por diferença de densidade (Figura 2-8), evitando as reações de caramelização da concentração térmica e preservando os aromas.



Figura 2-8: Interface de separação cristais de gelo e extrato de café (Freeze Concentration - GEA, 2013).

Por outro lado o extrato de café produzido por hidrólise térmica (CHT), que contém voláteis indesejados, é normalmente concentrado por evaporadores térmicos tipo *falling film* de múltiplos efeitos e com termo compressão. Neste processo o importante é evaporar água com menor custo e atingir altas concentrações (55 % m/m), não sendo necessários cuidados para preservação dos voláteis (SIVETZ; DESROSIER, 1979).

O extrato concentrado final é proveniente da mistura dos extratos concentrados EA e CHT, sendo que ambos apresentam contribuições positivas para obtenção do produto final. A última etapa do processo produtivo é a secagem, cujos processos utilizados são a secagem por *Spray Drying* (ar quente), produzindo café solúvel na forma de pó denominado *Spray Dried* (Figura 2-9 a) ou a Liofilização (*Freeze Drying*), onde o café solúvel é denominado Liofilizado (Figura 2-9 b). Nesta etapa o café solúvel passa a ter umidade abaixo de 5%, estando pronto para ser embalado para o consumidor e comercializado (SIVETZ; DESROSIER, 1979).



Figura 2-9: a) café solúvel *Spray Dried* e b) Café Solúvel Liofilizado

Na Figura 2-10 apresenta-se um fluxograma de todo o processo onde é possível visualizar simplificadamente todas as etapas de produção do café solúvel.

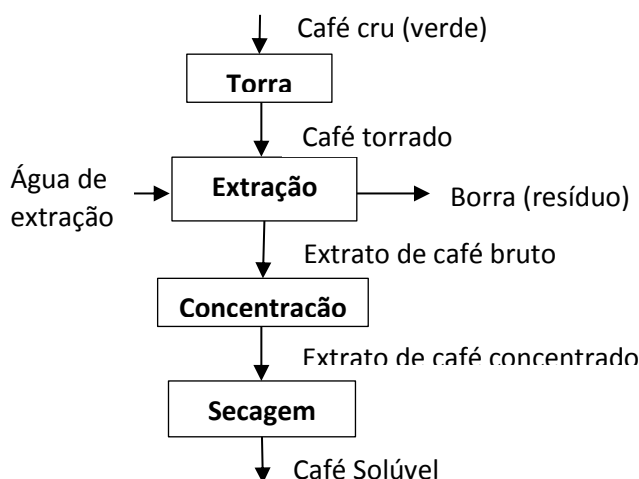


Figura 2-10: Fluxograma de produção de café solúvel (SIVETZ; DESROSIER, 1979)

Nos dias atuais a borra (Figura 2-10), que é um resíduo do processo de extração, é prensada mecanicamente e utilizada como biomassa para gerar vapor em substituição aos combustíveis fósseis. Alguns pesquisadores possuem interesse em transformar este subproduto agrícola em biodiesel, etanol, substrato para produção de enzimas, substrato para produção de cogumelos e fibras para adição em alimentos (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012).

2.2 – Tecnologias Enzimáticas no Processamento do Café

Atualmente a tecnologia enzimática é aplicada em muitos setores da indústria alimentícia, como panificação, produção de açúcar, cerveja, vinho, sucos e laticínios. As enzimas contribuem para melhorar a qualidade (biotransformação de produtos indesejados) e reduzir os custos de produção (aumento de rendimento e redução de tempo de processamento). Com isso, os consumidores possuem acesso a alimentos de melhor qualidade e com um custo reduzido (NOVOZYMES, 2013).

Por outro lado, na indústria de processamento de café, que é um negócio bilionário, poucas aplicações são registradas em escala industrial. Um dos propósitos desta revisão é enfatizar algumas aplicações potenciais para este ramo de negócio, com foco nas aplicações que utilizam enzimas na hidrólise de polissacarídeos, que são os compostos presentes em maior quantidade no café torrado.

2.2.1 – Aplicações Gerais de Enzimas em Café Cru (Verde)

Aprimorar a Qualidade do Café Cru (matéria-prima)

O café mais caro do mundo é o Café Civeta, e uma simples xícara pode custar mais que US\$30,00 (STRAND, 2010), sendo que o sabor especial desta bebida é atribuído a um gato selvagem tropical, denominado Kopi Luwak (*Paradoxus hermaphrodites*), também conhecido como Civeta. Este animal se alimenta do café em cereja no campo e o Café Civeta é expelido pelo seu trato digestivo. Porém, somente uma quantidade pequena de café é produzida por este processo, que acaba justificando seu alto preço.

No Brasil, um tipo de café similar é produzido por uma ave denominada Jacu (*Penelope ochrogaster*), cujo café expelido é denominado de *Jacu Bird Coffee*, comercializado por aproximadamente US\$120,00 por quilograma (KIEFER, 2010) .

Visando aumentar a escala de produção e não necessitar de um animal selvagem para processar este tipo de café, Martinez e Baladan (2009) propuseram o tratamento do café despulpado com enzimas *in vitro*, buscando reproduzir o ambiente do estômago dos animais. Basicamente os grãos de café são adicionados em um banho contendo água deionizada, e o pH do meio foi ajustado com ácido clorídrico para a faixa de 1,5 a 2,0, logo após adicionaram 11,01 g de pepsina (Sigma-Aldrich, produzida à partir da mucosa gástrica de suínos) por 1 kg de café. Após 12 h de tratamento enzimático, a 35 °C, o café foi lavado para remoção do ácido e das enzimas, sendo seco e torrado nas mesmas condições de uma amostra sem o tratamento enzimático. Provadores treinados avaliaram o café e descreveram a amostra processada como menos amarga que a amostra sem tratamento, considerando a amostra obtida a partir do café tratado como de qualidade superior.

O sabor e aroma do café são gerados no processo de torra, onde ocorrem as reações de Maillard (BALTES, 1982). Então, o tratamento de grãos de café com proteases e carboidrases pode modificar a disponibilidade de aminoácidos e açúcares redutores que participam nessas reações, interferindo nas reações de Maillard e consequentemente na qualidade do café torrado. Portanto, o estudo dos mecanismos de gerações dos sabores e aromas do café, combinado com o uso de enzimas, que alteram os reagentes iniciais das reações que ocorrem na torra, é um campo promissor de pesquisa, podendo produzir cafés processados com qualidades singulares.

Redução de Contaminantes Químicos

A acrilamida é um composto químico formado durante o processamento térmico, que apresenta potencial carcinogênico em cobaias de laboratório e seus efeitos provavelmente se estendem aos humanos. Em pesquisas sobre a formação de acrilamida em café torrado, encontrou-se uma quantidade média de acrilamida de 708 ppb (café conilon) e 374 ppb (café arábica). Investigações sobre a formação da acrilamida identificaram a asparagina como reagente limitante, que reage com açúcares redutores durante o processo de torra (BAGDONAITE; DERLER; MURKOVIC, 2008).

A solução proposta para reduzir a formação de acrilamida é o tratamento do café verde com asparaginase, convertendo asparagina em ácido aspártico no café verde (conversão de 40%), umectando-se os grãos com a solução enzimática. Após a torra, observou-se redução de 30% na formação de acrilamida (DRIA et al., 2004).

Atualmente o foco das agências governamentais como o FDA está nos alimentos que são maiores fontes de acrilamida, como, por exemplo, a batata frita, para os quais existem soluções comerciais em desenvolvimento, como o preparado enzimático Acrilaway® (Novozymes®). Embora em cafés com grau de torra mais avançado (temperaturas acima de 220 °C) verifique-se a degradação térmica da acrilamida, o processo enzimático poderá ser aprimorado e utilizado na produção de café com teor de acrilamida reduzido (BAGDONAITE; DERLER; MURKOVIC, 2008).

Acelerar o Processamento Pós-Colheita

Os frutos do café colhido no campo podem ser beneficiados pelo processo via úmida, onde estes são separados da casca por um processo mecânico, obtendo um grão de café envolvido no pergaminho (endocarpo) e mucilagem (mesocarpo). Para separar a mucilagem o processo é chamado de degomagem, onde o fruto descascado é fermentado em água por um período de aproximadamente 80 horas, eliminando naturalmente a mucilagem. Para acelerar o processo de degomagem utilizam-se enzimas pectinolíticas, reduzindo-se este processo para aproximadamente 20 horas (KASHYAP et al., 2001).

2.2.2 – Utilização de Enzimas na Biotransformação de Compostos Específicos do Café

Extração de Ácido Hidroxicinâmico da Polpa do Café

Os ácidos ferúlico, caféico e clorogênicos (derivados do ácido hidroxinâmico por reações de esterificação) e apresentam propriedades anticarcinogênicas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Esses compostos estão presentes tanto no grão como na polpa do café (parte externa do grão), sendo solubilizados da parede celular por hidrólise com a enzima feruloil esterase (E.C. 3.1.1.73), obtida por fermentação em estado sólido, utilizando-se azeite de oliva ou polpa de café como substratos, pelo micro-organismo *Rhizomucor pusillus*. A solubilização destes compostos pelo processo enzimático gera produtos de alto valor agregado deste resíduo agrícola (TORRES-MANCERA et al., 2011).

Aumento da Capacidade Antioxidante do Extrato de Café

Através de enzimas (Tanase – E.C. 3.1.1.20, Palatase 20.000 L da Novozymes® – E.C. 3.1.1.3) ou micro-organismos (*Lactobacillus johnsonii*) que efetuam a hidrólise dos ácidos clorogênicos do extrato de café, aumentou-se em aproximadamente 30 vezes a capacidade antioxidante, permitindo que o extrato seja utilizado para produzir diversos

alimentos funcionais ou utilizá-lo como antioxidante natural para alimentos (BEL-RHLID et al., 2009).

2.2.3- Produção de Compostos com Aplicações Farmacêuticas ou em Cosméticos

Neste século foram depositadas 479 patentes que contêm as palavras chaves “café” e “enzimas”. A maioria dessas patentes foi depositada por grandes empresas europeias nas áreas de alimentos, cosméticos, medicamentos e enzimas, sendo que 199 delas têm aplicações nas áreas farmacêuticas ou de cosméticos (Figura 2-11), que foram pesquisadas na *Web of Knowledge* (www.isiknowledge.com) utilizando a base de dados *Derwent Innovation Index*[®]. As finalidades vão desde formulações de cosméticos para retardar o envelhecimento e distúrbios na pele, até produtos com propriedades anti-inflamatórias (BEL-RHLID et al., 2009) ou para o tratamento do mal de Alzheimer. Possivelmente uma parte da produção de café migrará da prateleira dos supermercados para as farmácias ao longo dos próximos anos.

Área de Estudo	REGISTROS	% de 479	GRÁFICO DE BARRAS
QUÍMICA	464	96.8685 %	
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	317	66.1795 %	
BIOTECNOLOGIA	259	54.0710 %	
FARMACOLOGIA	199	41.5449 %	
INSTRUMENTAÇÃO	117	24.4259 %	
AGRICULTURA	112	23.3820 %	
CIÊNCIAS DOS POLÍMEROS	95	19.8330 %	
ENGENHARIA	62	12.9436 %	
CIÊNCIAS DOS MATERIAIS	21	4.3841 %	
ENERGIAS E COMBUSTÍVEIS	9	1.8789 %	

Figura 2-11: Resultado de pesquisa em banco de Patentes de 2001 a 2013 com palavras chaves “COFFEE” e “ENZYME” (www.isiknowledge.com, base de dados *Derwent Innovation Index*[®]).

2.2.4 – Hidrólises dos Polissacarídeos do Café

Redução de Sedimentos em Extrato de Café:

Após o processo de extração dos sólidos solúveis do café, o extrato obtido é resfriado à temperatura ambiente para continuar o processamento. Nesta etapa normalmente aparecem sedimentos, exigindo etapa de centrifugação ou filtração. Delgado et al. (2008) mostraram que o sedimento de extrato de café continha 54,7% de carboidratos, cujo principal constituinte era a manose. Os autores hidrolisaram o sedimento de forma eficiente com os preparados enzimáticos Rohapect B1L (AB Enzymes) e Galactomananase (ACH) tornando-o solúvel, contribuindo para aumentar o rendimento na produção de café solúvel.

Redução de viscosidade:

O principal constituinte do extrato de café responsável pela viscosidade é o galactomanano (biopolímero com a cadeia principal de manose, com ramificações de galactose). Para permitir a concentração do extrato de café em altas concentrações por processo de osmose reversa, foi proposta a hidrólise enzimática de galactomananos, reduzindo o tamanho da cadeia polimérica e a viscosidade, respectivamente (OSAMU; HIROSHI; YOSHIYUKI, 2003).

Um método também foi patenteado pela empresa Ueshima Coffee Company (UCC) para reduzir a turbidez e a formação de precipitados em extratos de café concentrados termicamente, no qual foram empregadas enzimas que hidrolisam os galactomananos do café presentes no extrato antes da concentração em evaporadores (AKIRA et al., 2003).

Nicolas et al. (1998) patentearam a utilização da enzima β -mananase (*Aspergillus niger*) imobilizada por ligações covalentes em suporte Eupergit-C[®] com recuperação de 80% da atividade da enzima livre e efetuaram hidrólise de galactomananos em extrato de café por 500 ciclos de utilização, mantendo 60% da atividade enzimática imobilizada inicialmente.

Extração de sólidos solúveis com auxílio de enzimas

SILVER et al. (2007) depositaram patente na qual apresentam um processo de extração de café. As principais etapas presentes no processo desenvolvido por Silver são descritas a seguir: i) grãos de café torrado arábica foram moídos com diâmetro médio de 900 μm e extraídos em um tanque adicionando-se água a 85 °C na razão 1:5 (m/m), mantendo o sistema em agitação por 30 minutos, com rendimento em base seca de 25%; ii) o material não solubilizado foi diluído em água na proporção 1:10 (m/m), moído novamente

em diâmetro médio de 75 μm (moinho coloidal de esferas com zircônio), e submetido à hidrólise enzimática por 16 horas a 50 $^{\circ}\text{C}$ com 0,0275% (m/m) de Mannaway 25L (Novozymes), que é um preparado com atividades celulases e β -mananases, juntamente com 0,0275% RS-103 (logen, Ottawa, Canada), preparado com atividade de β -mananases e β -glucanases; iii) a reação foi interrompida por resfriamento, os insolúveis separados por filtração e o sobrenadante processado em módulo de ultrafiltração para recuperação das enzimas. Ainda de acordo com os pesquisadores, a hidrólise enzimática conduzida conforme descrito anteriormente acrescentou mais 38% ao rendimento em relação ao café torrado. Além disso, o café produzido por hidrólise enzimática apresentou características sensoriais superiores (característica de menos processado), quando comparado com café solúvel hidrolisado termicamente.

Os estudos de hidrólise dos polissacarídeos do café serviram de fundamentação para a execução dos estudos descritos nos capítulos 3, 4 e 5, visando a substituição da etapa de hidrólise térmica e aprimoramento do processo. Devemos destacar que os preparados enzimáticos comerciais utilizados por Silver et al. (2007) foram descontinuados pelos respectivos fabricantes.

3. Análise Comparativa de Hidrólise Térmica e Enzimática do Resíduo da Extração do Café Torrado

RESUMO

A indústria do café solúvel movimenta mais de 12 bilhões de dólares anualmente, consumindo 1,5 bilhões de toneladas de grãos de café. No processo industrial tradicional, a obtenção deste produto compreende a extração de polissacarídeos por tratamento térmico. Caracterizada pelo elevado rendimento proporcionado pelas altas temperaturas empregadas, a etapa de hidrólise térmica do resíduo de extração leva à produção de um café solúvel com qualidade inferior devido à formação de compostos voláteis indesejáveis como acetaldeído, furfural e 5-hidroxi-metil-furfural, provenientes da degradação térmica dos carboidratos. Neste trabalho, tratamentos térmico e enzimático são comparados em termos do rendimento do processo de obtenção do café solúvel e de sua composição em carboidratos e compostos voláteis. A fração extrato aromático foi obtida por extração de grãos torrados de café arábica com água a 125 °C, gerando um resíduo não solubilizado que foi submetido à hidrólise térmica (180 °C) ou enzimática. Experimentos de hidrólise enzimática foram conduzidos a 50 °C, em solução tampão citrato 50 mM e pH 5,0, utilizando os preparados comerciais Powercell, Galactomananase HBI Enzymes e Ultraflo XL, com atividades de celulases, galactomananases, galactanases e β -glucanases, selecionados dentre 11 produtos avaliados. Com rendimento de 18,4%, semelhante ao da etapa de extração (20 %) e inferior ao da hidrólise térmica (28%), a hidrólise enzimática gerou fração solubilizada com baixo teor de compostos indesejáveis e alta concentração de açúcares livres. Em açúcares totais, a fração solubilizada enzimaticamente apresentou concentração intermediária (21%) em comparação à dos produtos obtidos por hidrólise (36%) e extração térmicas (8%).

Termos para indexação: carboidrato, enzima, extração, degradação térmica, café solúvel.

Comparative Analysis of Thermal and Enzymatic Hydrolysis from Extracted Roasted Coffee Residue

ABSTRACT

Instant coffee industry moves more than USD 12 billion yearly and it consumes 1.5 billion tons of coffee beans. In a traditional industrial process, this product is obtained by thermal extraction of polysaccharides. Characterized by the increased yield resulting from the high temperatures employed, the thermal hydrolysis of the extraction residue leads to the production of an instant coffee with lower quality due to the formation of unwished chemical compounds such as acetaldehyde, furfural and 5-hidroxi-metil-furfural, which arise from the thermal degradation of carbohydrates. In this work, thermal and enzymatic processes are compared in terms of yield, carbohydrate and volatile compositions. The aroma extract fraction was obtained by extraction of roasted arabica coffee beans with water at 125 °C, generating a non-soluble residue, that was then submitted to thermal (180 °C) or enzymatic hydrolysis. Enzymatic hydrolysis experiments were carried out at 50 °C, with 50 mM citrate buffer solution at pH 5.0, using commercial enzyme preparations Powercell, Galactomananase-HBI and Ultraflo XL, with cellulases, galactomannases, galactanases and β -glucanases activities, selected from 11 enzyme preparations analyzed. With yield of 18.4%, similar to the extraction step (20 %) and inferior than the one achieved at thermal hydrolysis (28%), enzymatic hydrolysis produced soluble material with low content of unwished volatiles and high concentrations of free sugars. Regarding total sugars, enzymatic solubilized material exhibited an intermediate concentration (21%) when compared to the products generated by thermal hydrolysis (36%) and extraction (8%).

Index terms: carbohydrate, enzyme, extraction, thermal degradation, instant coffee

3.1 - INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, tendo o Brasil como maior produtor mundial com 50,8 milhões de sacas em 2012 (35 % da produção mundial), seguido pelo Vietnã, Indonésia e Colômbia. Entre maio de 2011 e abril de 2012, o consumo *per capita* de café no Brasil atingiu 4,94 kg/habitante, posicionando o país como o segundo consumidor mundial de café, ultrapassando a França e a Itália (ABIC, 2013).

O café é consumido principalmente na forma tradicional, como pó torrado e moído para preparo da bebida em coador ou ainda em sachê ou cápsulas, utilizados nas cafeteiras mais modernas. Porém, o café solúvel nas mais diversas formas (*spray dried*, granulado ou liofilizado) vem ganhando importância no mercado, tanto pela praticidade como pela qualidade superior. O café solúvel também é um ingrediente muito utilizado industrialmente no preparo de cappuccinos, bebidas líquidas à base de café, bolos e sorvetes, entre outros. Além de ser apreciado pelas características de aroma e sabor, propriedades funcionais, como a antioxidante, de diferentes substâncias presente no café já foram comprovadas (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2012).

Os produtos descritos acima são obtidos a partir das duas variedades principais de café: i) *Coffea arabica* (ou arábica), correspondendo a 70% da produção mundial e apresentando sabor mais suave e aromático; ii) *Coffea canephora* (ou robusta), correspondendo a cerca de 30% do mercado mundial e possuindo um sabor mais amargo, além de conter 50% mais cafeína que o café arábica (CLARKE & VITZHUM, 2001). Em termos de composição, após a torrefação, o café arábica apresenta, em fração mássica, 48,1% de carboidratos, 15,9% de lipídeos, 6,8% de proteínas e 29,2% de outros compostos (OOSTERVELD et al., 2003).

Os carboidratos, principais componentes do café torrado presentes no produto café solúvel, apresentam a seguinte composição (em fração molar): 51% de manose, 21% de galactose, 16% glicose, 6% de arabinose, 4% de ácido urônico e 1% de ramnose (OOSTERVELD et al., 2003). Esses carboidratos se encontram predominantemente na forma de polissacarídeos, já que aqueles de menor massa molecular sofrem degradação durante o processo de torra. Por sua vez, os polissacarídeos presentes no café compõem a

estrutura dos biopolímeros galactomananos (GMs), arabinogalactanos (AGs) e celulose (ARYA & RAO, 2007).

As condições empregadas durante o processo de extração e hidrólise do café torrado determinam tanto a qualidade do produto como o rendimento do processo. A extração para o preparo da bebida de café, quando efetuada de forma doméstica (com água a 98°C), pode apresentar um rendimento inferior a 20% (MARTINS et al., 2005). Em processos industriais para produção de café solúvel e outros derivados, é necessário recuperar polissacarídeos de maior peso molecular para a obtenção de produtos concentrados, apresentando as propriedades físico-químicas desejadas, tais como menor higroscopicidade e maior temperatura de transição vítrea (DELGADO et al., 2008).

Tradicionalmente, a produção de café solúvel e outros derivados é realizada pelo processo Gea-Niro (2013), constituído de uma extração térmica a 125 °C e uma hidrólise térmica a 180 °C, seguida pelas operações de concentração por evaporação e secagem por *spray dryer* ou liofilização. Na etapa de extração térmica, obtém-se um extrato com boas qualidades aromáticas, mas baixo rendimento. Assim, para atingir rendimentos da ordem de 48% (café arábica) ou 54% (café robusta), é incorporada a etapa de hidrólise térmica. Porém, há dois grandes inconvenientes inerentes às condições empregadas nesta etapa do processo Gea-Niro: grande consumo energético e geração de compostos indesejáveis provenientes da degradação de carboidratos, onde se destacam o furfural, o acetaldeído e o 5-hidróxi-metil-furfural (5-HMF) (DE MARIA et al., 1994). Uma alternativa promissora ao processo de hidrólise térmica consiste na solubilização dos polissacarídeos de maior massa molecular por hidrólise enzimática. Neste caso, um produto de alta qualidade, isento de produtos de degradação, poderia ser obtido com baixo consumo energético (SILVER et al., 2005).

Embora se utilize enzimas em algumas etapas do processamento industrial do café (DELGADO et al., 2008), o processo de obtenção dos polissacarídeos solúveis por via enzimática ainda é pouco explorado. Mahammad et al (2007) estudaram a hidrólise de GMs e identificaram três enzimas atuando em sinergia na reação: β -manosidase, β -mananase e

α -galactosidase, que catalisam a hidrólise em três pontos diferentes da cadeia de GMs. Conforme mostra a Figura 3-1, a primeira enzima atua nas ligações não redutoras β -1,4 da cadeia de manose, enquanto que a segunda atua nas ligações β -1,4 no interior da cadeia de manose e a terceira atua nas ligações α -1,6 entre manose e galactose (MAHAMMAD et al., 2007).

Para a hidrólise enzimática dos AGs por hidrólise enzimática, foram identificadas enzimas denominadas galactanases, que atuam nas ligações entre as galactoses na estrutura principal deste polissacarídeo, cuja atividade é encontrada em enzimas pectinolíticas comerciais (LUONTERI et al., 2003).

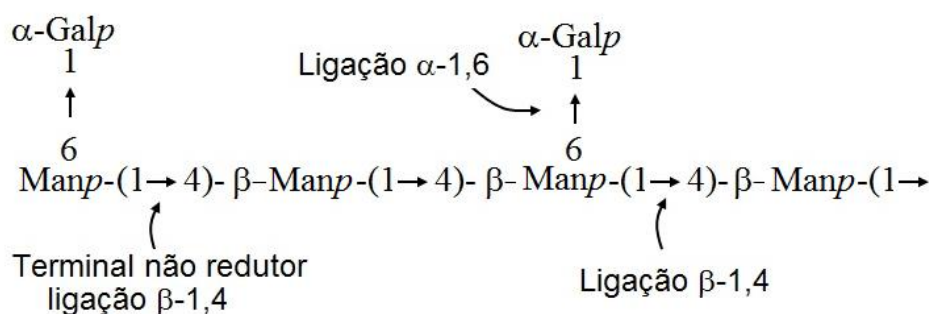


Figura 3-1: Estrutura de GM mostrando a ligação α -1,6 hidrolisada pela α -galactosidase, a ligação β -1,4 no interior da cadeia hidrolisada pela β -mananase e a ligação β -1,4 não redutora hidrolisada pela β -manosidase.; p : piranose (MAHAMMAD et al., 2007).

Já de acordo com Kasai e colaboradores (2006) que estudaram a composição da parede celular do café torrado, devido à presença de celulose entrelaçada aos AGs e GMs, é recomendável o uso de enzimas com atividade de celulasas e β -glucanases para facilitar o acesso aos substratos das enzimas β -manosidase, β -mananase, α -galactosidase e galactanases, potencializando a solubilização dos carboidratos presentes.

Este trabalho teve como objetivos caracterizar preparados enzimáticos comerciais quanto à atividade das principais enzimas envolvidas na hidrólise dos polissacarídeos presentes no café torrado e comparar o produto obtido pela hidrólise enzimática com os similares obtidos por extração e hidrólise térmica.

3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 - Materiais

a) Café torrado

Utilizaram-se grãos de café arábica torrado da marca Café Iguaçu Espresso com grau de torra médio.

b) Preparados enzimáticos

Foram avaliados 11 diferentes preparados enzimáticos comerciais como fontes das principais enzimas que atuam na degradação dos polissacarídeos do café, e as atividades teóricas estão indicadas (quando declaradas pelo fornecedor por grama ou mL de preparado enzimático comercial), sendo: i) Celulases: Celluclast[®] 1.5L (Novozymes[®]) – 700 *Endo-Glucanase Units* (EGU)/g, Powercell e Celumax C (Prozyn Biosolutions); ii) Galactomananases: Galactomananases (HBI Enzymes, Japão) – 18000 UI/g; Cellulax GM-L (Prozyn Biosolutions) e Rhoapect[®] B1-L (AB-Enzymes) – 9600 *Polygalacturonase Units* (PGU)/g, iii) β -glucanase: Ultraflo[®] XL (Novozymes[®]) – 45 *Fungal Beta-Glucanase* (FBG)/g, iv) galactanases (pectinases): Viscozyme[®] L – 100 FBG/g, Pectinex[®] Ultra Clear – 7900 PGU/mL, Pectinex[®] Ultra SP-L – 95500 PGU/mL e Ultrazym[®] AFP L. Os preparados foram caracterizados em termos das atividades em celulases, galactomananases, β -glucanases e galactanases de acordo com a metodologia descrita a seguir.

3.2.2 - Métodos Analíticos

Determinação das atividades enzimáticas

Todos os preparados enzimáticos foram caracterizados em termos das atividades presentes de acordo com as seguintes metodologias: i) celulases: atividade medida pelo método da IUPAC (GHOSE, 1987), utilizando como substratos papel de filtro (Whatman n^o1) e celobiose (Sigma-Aldrich); ii) galactomananases: atividade determinada pelo método das velocidades iniciais, utilizando como substrato solução 0,5% de goma locusta (Sigma) em

tampão citrato 50 mM com pH 5,0 a 50 °C (DELGADO et al., 2008); iii) β -glucanase: atividade quantificada pelo método das velocidades iniciais, utilizando como substrato solução 1% de β -glucano de cevada (Fluka) em tampão citrato 50 mM com pH 5,0 a 50 °C (YANG et al., 2008); iv) galactanases: atividade quantificada pelo método das velocidades iniciais, utilizando como substrato solução de goma arábica (Sigma-Aldrich) 1,0% em tampão citrato 50mM com pH 5,0 a 50 °C (MAHENDRAN et al., 2008).

Determinação de umidade

A umidade dos materiais sólidos utilizados e produzidos nos experimentos foram determinadas em sistema de aquecimento por lâmpada de halogêneo (Mettler Toledo, HB43-S Halogen), com calibração para reproduzir os resultados do método ISO 3726 (1983).

Fração mássica de sólidos solúveis

A fração mássica de sólidos solúveis nos produtos obtidos por extração e hidrólise térmicas foi determinada a partir da leitura do °Brix empregando refratômetro (Atago® – RX-5000) com ajuste automático da temperatura da amostra para 25 °C. Os valores lidos foram convertidos em fração mássica de sólidos solúveis utilizando tabela de conversão apresentada por Sivietz & Desrosier (1979).

Análise de carboidratos

Os carboidratos extraídos foram quantificados como açúcares solúveis livres e totais por HPAEC-PAD (*High Performace Anion Exchange Cromatography – Pulsed Amperometric Detector*), utilizando o método ISO 11292 (15/06/1995). Para a determinação dos açúcares livres, 300 mg das amostras foram dissolvida em balão volumétrico com água deionizada até o volume de 100 mL, filtradas em coluna C 18 (Millipore®) e 20 μ L de cada amostra foram injetada no cromatógrafo. Para a determinação dos açúcares totais, 300 mg amostras foram previamente submetidas à hidrólise em 50 mL de HCl 1,0 M a 98 °C por 2,5 horas (em

frasco fechado) e então analisadas da mesma forma que os açúcares livres. A concentração de polissacarídeos solubilizados foi estimada em termos de açúcares solúveis não livres, obtidos a partir da diferença entre os valores correspondentes às concentrações de açúcares solúveis livres e totais.

As condições cromatográficas utilizadas são as seguintes: eluente A: água ultra pura Milli-Q (18M Ω /cm); eluente B: hidróxido de sódio 300 mM; injeção: 20 μ L; vazão: 1 mL/min.; pressão da bomba quaternária: ~ 1300 psi (89,63 bar); solução pós-coluna: vazão 0,6 mL/min para que o pH se estabilize entre 12,5 e 13,0; aquisição de dados: corrida isocrática com eluente A (0 a 50 minutos); Etapa de Limpeza com eluente B (50,1 a 65 minutos); reequilíbrio da coluna de 65,10 a 80 minutos com eluente A.

Análise de compostos aromáticos extraídos

Os compostos acetaldeído, furfural e 5-hidróxi-metil-furfural (5-HMF) foram quantificados em uma solução contendo 3,0% (m/m) de material extraído por HS-SPME-GC-MS (*Head Space – Solid Phase Micro Extraction – Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) da seguinte forma (VIEGAS & BASSOLI, 2007).

- a) Extração dos Voláteis (HS-SPME): 1,0 mL da solução de café foi introduzida em vial de cromatografia (Agilent 20 mL) que foi selado com septo de silicone. Então a microfibras foi introduzida através do septo e o frasco foi mantido a 70 °C por 30 minutos, então o septo é introduzido no injetor do cromatógrafo.
- b) Condições do cromatógrafo (GC-MS): Coluna HP INNOVAX (60 m x 320 μ m x 0,25 μ m), o injetor operou em modo *splitless* com temperatura de 250 °C e o forno com temperatura inicial de 40 °C (5 min), 40 a 60 °C 4 °C/min (5 min) e 60 a 250 °C 8 °C/min (3 min). O gás de arraste hélio manteve fluxo constante de 1,2 mL/min. O detector operou nas seguintes condições: energia de ionização: 70 eV, temperatura de interface: 280 °C, temperatura de quadripolo: 150 °C, temperatura de fonte de íons: 230 °C.

Procedimento Experimental

A matéria-prima café arábica torrado foi inicialmente submetida à extração térmica dos componentes solúveis, gerando o extrato aromático (EA). A fase sólida resultante desse procedimento (resíduo da extração - RE), contendo ainda alto teor de carboidratos não solubilizados, foi então utilizada para a obtenção dos produtos via hidrólise enzimática (CHE) e hidrólise térmica convencional (CHT). A Figura 3-2 mostra esquematicamente o procedimento experimental adotado. As condições empregadas em cada etapa são descritas a seguir.

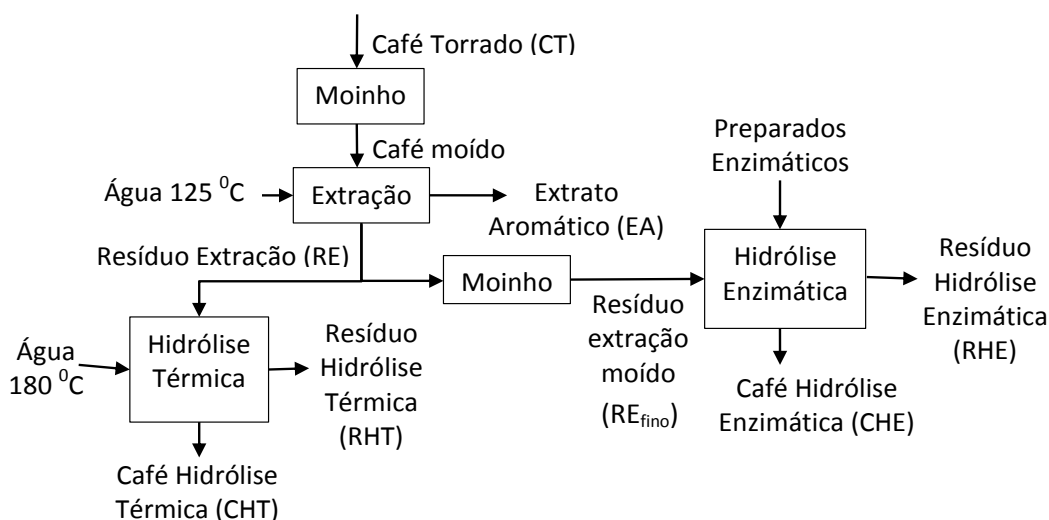


Figura 3-2: Fluxograma de obtenção de café solúvel pelos processos de extração, hidrólise térmica e enzimática.

Extração térmica dos materiais solúveis do café

Os grãos de café torrado (CT), previamente moídos em partículas de tamanho entre 0,5 e 2,0 mm, foram submetidos a processo de extração em sistema contracorrente (escala piloto), dotado de três colunas extratoras com filtro na saída, utilizando água de alimentação a 125 °C, com um fator de extração 2,0 (2,0 kg de extrato para 1,0 kg de café alimentado), e tempo entre os ciclos de 30 minutos. O extrato produzido (extrato aromático-EA) foi imediatamente resfriado a 25 °C e analisado em termos de composição em carboidratos e voláteis. O extrato foi liofilizado e o rendimento (R) do processo foi calculado de acordo com a equação 3.1.

$$R = \frac{m_{SS}}{m_{CT}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

onde: m_{SS} é a massa de sólidos solúveis obtida e m_{CT} é a massa inicial de café (CT) processado, em base seca. O valor de m_{SS} foi determinado pela equação 3.2:

$$m_{SS} = \frac{m_{EA} \cdot x_{EA}}{100} \quad (3.2)$$

onde m_{EA} – massa de EA (g, em base seca), x_{EA} – fração mássica de sólidos solúveis (em %).

O resíduo da extração (RE) foi submetido à hidrólise térmica ou hidrólise enzimática, cujas condições são detalhadas a seguir.

Hidrólise térmica

O resíduo RE foi transferido para colunas extratoras e hidrolisado termicamente em sistema contracorrente (escala piloto) contendo 4 colunas, dotadas de filtro na saída, utilizando água de alimentação a 180 °C, com um fator de extração 7,0 (7,0 kg de extrato para 1,0 kg de café alimentado), e tempo entre ciclos de extração de 30 minutos. O produto contendo os componentes solubilizados, café solúvel hidrólise térmica (CHT), foi imediatamente resfriado a 25 °C e submetido às mesmas análises já mencionadas anteriormente para o produto EA. O produto obtido foi ainda liofilizado e o rendimento foi calculado (Eq. 1). A massa de sólidos solúveis (m_{SS}) foi determinada de maneira análoga à expressa pela Eq. 2, substituindo-se m_{EA} e x_{EA} pela massa de CHT (m_{CHT}) e sua fração mássica em sólidos solúveis (x_{CHT}) correspondente.

Hidrólise Enzimática

O resíduo RE (Figura 3-2) foi seco em estufa a 60 °C até atingir umidade inferior a 3,0% (m/m), resfriado à temperatura ambiente, processado em moinho de laboratório refrigerado a 5 °C (IKA® - modelo A10) e peneirado para obtenção de partículas menores que 500 µm (RE_{fino}). A hidrólise enzimática foi conduzida em microreator de 250 mL, contendo 20 g de

RE_{fino} e 200 mL de tampão citrato (50 mM, pH 5,0), sob agitação mecânica de 350 RPM (Agitador Tecnal TE-139), a 50 °C. A hidrólise foi iniciada com a adição dos preparados enzimáticos que apresentaram maiores atividades em celulasas, galactomananase e β -glucanase, previamente selecionados (através da medida de atividade). O volume adicionado foi calculado para obter concentração dos preparados enzimáticos selecionados no meio de reação de 0,06% de galactomananase, 0,06% de celulase e 0,06% de β -glucanase (massa de enzima por massa de substrato em base seca). Essas porcentagens foram definidas de acordo com as recomendações técnicas dos fornecedores dos preparados enzimáticos.

Os experimentos (em duplicata) foram conduzidos por 71 horas e o progresso de hidrólise foi acompanhado pela liberação de açúcares redutores, cuja curva de calibração foi construída com a manose, pelo método DNS (Müller, 1959). A reação foi interrompida por resfriamento a 5 °C e o conteúdo do reator foi centrifugado a 3000 RPM por 20 minutos. Para a obtenção do produto café solúvel hidrólise enzimática (CHE), o sobrenadante foi liofilizado e também caracterizado em termos de composição em carboidratos e voláteis. O rendimento do processo foi calculado pela equação 3.1, sendo a massa de sólidos solúveis (m_{SS}) igual à massa obtida após a liofilização em base seca.

Análise Estatística

Os produtos obtidos a partir dos diferentes tratamentos empregados foram comparados em termos de composição nos principais carboidratos (arabinose, glicose, galactose e manose) e nos compostos aromáticos, utilizando-se o teste de Tukey (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978) com $p < 0,05$. O tratamento estatístico realizado no software STATISTICA 7.1 (STATSOFT INC, 2005), para análises em triplicata e as variações expressas com intervalo de confiança (IC) de 95%.

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção dos preparados enzimáticos comerciais

As atividades em celulases dos preparados enzimáticos comerciais contendo enzimas celulolíticas são apresentadas na tabela 3.1. Já a tabela 3.2 mostra as atividades medidas para as enzimas galactomananase, β -glucanase e galactanase nos demais preparados enzimáticos.

Tabela 3.1: Atividades em celulases nos 3 preparados enzimáticos celulolíticos (por g ou mL dos preparados enzimáticos comerciais).

PREPARADO	PAPEL DE FILTRO	CELOBIOSE
Powercell	463 \pm 15 FPU/g	1297 \pm 182 UI/g
Celumax C	300 \pm 7 FPU/g	512 \pm 25 UI/g
Celluclast 1.5 L	108 \pm 13 FPU/mL	13 \pm 1 UI/mL

Média \pm IC (95%) para n=3

Verifica-se na Tabela 3.1 que o preparado Powercell apresenta maior atividade em celulases, tanto no substrato papel de filtro como em celobiose. Adriano (2008) determinou atividade da Celluclast 1.5 L utilizando a mesma metodologia e obteve valores similares (110,4 \pm 0,5 FPU/mL).

Tabela 3.2: Atividades em galactomananases, β -glucanases e galactanases avaliadas em 8 preparados enzimáticos comerciais.

ATIVIDADE PRINCIPAL	PREPARADO	ATIVIDADE
Galactomananase	Galactomananase-HBI	18554 \pm 564 UI/g
	Cellulax GM-L	51 \pm 8 UI/g
	Rhoaspect B1-L	8 \pm 2 UI/mL
β -Glucanase	Ultraflo XL	1028 \pm 12 UI/g
Galactanases	Viscozyme L	4,0 \pm 0,3 UI/g
	Pectnex Ultra Clear	ND
	Pectnex Ultra SP-L	ND
	Ultrasym AFP L	ND

ND – Não detectado

Na Tabela 3.2, observa-se que o preparado com maior atividade de galactomananase é o produzido pela HBI Enzymes, enquanto o preparado Ultraflo XL possui atividade

expressiva de β -glucanase. Já para as galactanases somente o preparado Viscozyme L apresentou atividade, porém muito pequena, inviabilizando sua utilização.

Comparando os valores apresentados na Tabela 3.2 com as poucas informações disponíveis na literatura, constata-se que a atividade em galactomananase presente no preparado comercial Rhoaspect B1-L foi inferior ao valor de 32,8 UI/mL determinado por Delgado et al. (2008), utilizando a mesma metodologia. O produto Rhoaspect B1-L apresenta atividade principal em pectinase, sendo a atividade em galactomananase secundária, podendo variar significativamente de lote para lote (comunicação pessoal, AB-Enzymes).

Diante dos resultados obtidos, o *pool* de enzimas utilizado no processo de hidrólise enzimática foi constituído pelos preparados enzimáticos Powercell, Galactomananase HBI Enzymes e Ultraflo XL.

Caracterização dos produtos obtidos por extração térmica e hidrólise térmica

As características dos produtos EA e CHT, obtidos respectivamente por extração e hidrólise térmica (Figura 3.2), em termos de açúcares livres são apresentadas na Tabela 3.3. Nota-se que os tratamentos térmicos não contribuem para a formação de açúcares livres, cujas concentrações totais atingem 1,0 e 3,65 % para os produtos EA e CHT, respectivamente.

Tabela 3.3: Concentração em açúcares livres do extrato aromático (EA) e dos produtos obtidos por hidrólise térmica (CHT) e enzimática (CHE).

Açúcares Livres	EA (%)	CHT (%)	CHE* (%)
Manitol	0,09 \pm 0,02	0,01 \pm 0,00	ND
Fucose	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	ND
Arabinose	0,25 \pm 0,07 ^a	2,34 \pm 0,51 ^b	1,58 \pm 0,10 ^c
Galactose	0,04 \pm 0,01 ^a	0,59 \pm 0,12 ^b	0,47 \pm 0,02 ^b
Glicose	0,03 \pm 0,02 ^a	0,09 \pm 0,02 ^b	2,82 \pm 0,03 ^c
Sacarose	0,45 \pm 0,06	0,02 \pm 0,01	ND
Manose	0,04 \pm 0,00 ^a	0,38 \pm 0,10 ^b	7,24 \pm 0,31 ^c
Frutose	0,18 \pm 0,02	0,17 \pm 0,05	0,05 \pm 0,03
Ribose	ND	0,07 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02
Total	1,0 \pm 0,1 ^a	3,65 \pm 0,83 ^b	12,20 \pm 1,24 ^c

ND: não detectado. Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * Referente ao hidrolisado obtido ao final de 71 h de reação.

A Tabela 3.4 mostra as concentrações de açúcares totais, onde se destacam a alta concentração de galactose no CHT que, juntamente com a manose e a arabinose, contribui para a obtenção de um produto contendo 36 % de açúcares totais. Esse resultado comprova a alta eficiência da hidrólise térmica na solubilização de carboidratos.

Leloup e Liardon (1993) caracterizaram os açúcares totais de café arábica extraído a 95 °C encontrando um valor de aproximadamente 7,0%, que é similar ao resultado obtido no EA (125 °C). Os mesmos autores também analisaram a composição em açúcares totais de café arábica submetido à extração e hidrólise térmica a 180 °C, obtendo um produto contendo aproximadamente 20 % em açúcares totais, que é um valor intermediário entre as quantidades de açúcares totais do EA e CHT que foram extraídos separadamente.

Tabela 3.4: Concentração em açúcares totais para o extrato aromático (EA) e os produtos obtidos por hidrólise térmica (CHT) e enzimática (CHE).

Açúcares totais (%)	EA	CHT	CHE*
Manitol	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	ND
Fucose	0,02 ± 0,01	0,19 ± 0,05	ND
Arabinose	3,05 ± 0,53 ^a	4,64 ± 0,04 ^b	2,69 ± 0,61 ^c
Galactose	2,60 ± 0,44 ^a	20,11 ± 2,34 ^b	7,20 ± 0,12 ^c
Glicose	1,53 ± 0,04 ^a	0,73 ± 0,11 ^b	2,55 ± 0,22 ^c
Manose	0,86 ± 0,28 ^a	10,41 ± 0,82 ^b	8,93 ± 0,93 ^b
Total	8,15 ± 1,18 ^a	36,19 ± 3,20 ^b	21,37 ± 2,54 ^c

ND: não detectado. Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * Referente ao hidrolisado obtido ao final de 71 h de reação.

Conforme mostra a Tabela 3.5, arabinose, galactose e glicose são os principais constituintes dos oligossacarídeos presentes no EA, enquanto que carboidratos contendo galactose e manose predominam no CHT. A alta fração de carboidratos na forma não livre (total) presentes no CHT indica que o tratamento por hidrólise térmica é efetivo na liberação de biopolímeros de massa molecular superior.

Tabela 3.5: Concentração de açúcares não livres para o extrato aromático (EA) e os produtos obtidos por hidrólise térmica (CHT) e enzimática (CHE).

Açúcares Não Livres	EA (%)	CHT (%)	CHE* (%)
Manitol	ND	0,10 ± 0,02	ND
Fucose	ND	0,17 ± 0,05	ND
Arabinose	2,80 ± 0,53 ^a	2,29 ± 0,42 ^a	1,11 ± 0,61 ^c
Galactose	2,56 ± 0,44 ^a	19,53 ± 2,48 ^b	6,73 ± 0,12 ^c
Glicose	1,50 ± 0,04 ^a	0,64 ± 0,11 ^b	0,27 ± 0,22 ^c
Manose	0,82 ± 0,28 ^a	10,10 ± 0,82 ^b	1,69 ± 0,92 ^a
Total	7,68 ± 1,18 ^a	32,83 ± 3,20 ^b	9,80 ± 2,83 ^a

ND: não detectado. Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * Referente ao hidrolisado obtido ao final de 71 h de reação.

A comparação dos produtos EA e CHT em termos de composição em açúcares livres (Tabela 3.3), totais (Tabela 3.4) e não livres (Tabela 3.5) por meio do teste de Tukey confirma que ambos são estatisticamente distintos. Em todas as composições apresentadas (Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5), galactose, manose, glicose e arabinose se destacam como principais componentes, refletindo a constituição dos três principais biopolímeros presentes na estrutura do café (OOSTERVELD et al., 2003). Porém, a quantidade de produto obtido e a composição do mesmo em termos dos açúcares presentes são diretamente influenciadas pelos tratamentos empregados. A última linha da Tabela 3.5 mostra que as condições mais amenas empregadas no processo de extração térmica levam a uma recuperação de 75 % em oligossacarídeos solúveis em relação à hidrólise térmica. Nota-se ainda que oligossacarídeos contendo manose só são eficientemente produzidos nas condições de alta temperatura empregadas na hidrólise térmica, estando em concordância com Leloup e Liardon (1993), mostrando a dificuldade de solubilizar os GMs em temperaturas amenas por processo térmico.

Os rendimentos dos processos extração, hidrólise térmica e hidrólise enzimática, calculados pelas equações 1 e 2, são apresentados na Tabela 6.

Tabela 3.6: Rendimentos das etapas Extração, Hidrólise Térmica e Hidrólise Enzimática, calculados pelas Eq. 1 e 2.

Etapa	m_{CT} (g)	m_{EA} (g)	x_{EA} (%)	m_{ss} (g)	R (%)
Extração	2.100 ± 1	4.400 ± 1	9,55 ± 0,02	420 ± 1	20 ± 1
Hidrólise Térmica	2.100 ± 1	15.400 ± 2	3,84 ± 0,02	591 ± 2	28 ± 2
Hidrólise Enzimática	23,83 ± 0,01	---	---	4,38 ± 0,01	18,4 ± 0,0

m_{CT} : massa de café torrado em base seca, m_{EA} : massa de extrato em cada etapa, x_{EA} : fração mássica em sólidos solúveis, R: rendimento.

Em consequência da alta eficiência na solubilização de oligossacarídeos, o processo de hidrólise térmica (180 °C) apresentou o maior valor de rendimento, 40% superior ao observado para a extração térmica a 125 °C (Tabela 3.6). É importante destacar, no entanto, que a massa de oligossacarídeos solúveis contribui parcialmente para a massa de sólidos solúveis presente no EA, o qual contém ainda cafeína, proteínas, melanoidinas, ácidos orgânicos e outros compostos solúveis extraídos nesta etapa (ARYA & RAO, 2007), também quantificados como “ m_{SS} ” no cálculo do rendimento pela Eq. 1. Em termos de rendimento global (soma dos rendimentos da extração e da hidrólise térmica) alcançou-se 48%, valor idêntico ao estabelecido para o processo de produção de café solúvel Gea-Niro (2013) a partir do café arábica.

Finalizando a comparação entre os produtos obtidos por extração e hidrólise térmica, como esperado, verifica-se que a presença de compostos voláteis indesejáveis foi significativamente superior no produto CHT obtido pelo processo de hidrólise térmica, conforme mostra a tabela 3.7.

Tabela 3.7: Concentração de voláteis, em ppb, no extrato aromático (EA) e nos produtos obtidos por hidrólise térmica (CHT) e enzimática (CHE).

Compostos	EA	CHT	CHE*
Acetaldeído (ppb)	5.533 ± 221 ^a	14.733 ± 453 ^b	1.833 ± 52 ^c
Furfural (ppb)	24.133 ± 482 ^a	48.900 ± 733 ^b	167 ± 27 ^c
5 – HMF (ppb)	667 ± 26 ^a	2.667 ± 105 ^b	ND

ND: não detectado - Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * Referente ao hidrolisado obtido ao final de 71 h de reação.

Caracterização do produto obtido por hidrólise enzimática

O tratamento enzimático para promover a hidrólise dos polissacarídeos que constituem o resíduo do processo de extração térmica (Figura 3.2) é avaliado nesta seção. O perfil de produção de açúcares redutores com o tempo, resultante da ação do *pool* de enzimas selecionadas durante a reação de hidrólise, é apresentado na Figura 3.3. Nas Tabelas 3.3, 3.4, 3.5 e 3.7 foram incluídas também as concentrações de açúcares livres, açúcares totais, açúcares não livres e voláteis no produto CHE, respectivamente.

Observa-se na Figura 3-3 que cerca de 70 % dos açúcares redutores são liberados nas primeiras 25 horas de reação. O aumento na concentração de açúcares redutores pode ser atribuído tanto à liberação de açúcares resultante da ação direta das enzimas na cadeia dos biopolímeros da fração sólida como à hidrólise dos oligossacarídeos solubilizados pela ação enzimática. O perfil de produção de oligossacarídeos solúveis ao longo do tempo é uma questão importante para a otimização do processo de hidrólise enzimática e requer estudos mais aprofundados.

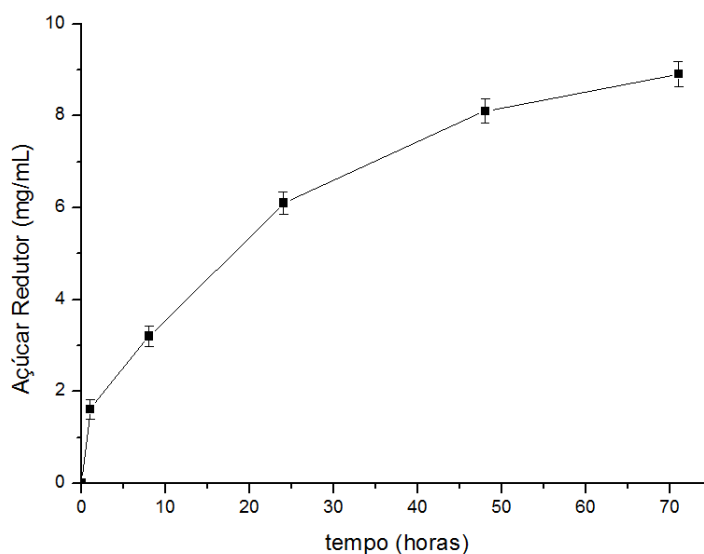


Figura 3-3: Produção de açúcares redutores com o tempo durante hidrólise enzimática realizada a 50 °C, pH 5,0, pelo *pool* de preparados enzimáticos comerciais Powercell, Galactomananase HBI Enzymes e Ultraflo[®] XL.

A concentração de açúcares livres no produto final obtido por hidrólise enzimática (Tabela 3.3) mostra que foi produzido 7,24% de manose (contra 0,38 % de manose pela hidrólise térmica), o que confirma a atividade de endo- β -1,4-mananase nos preparados enzimáticos utilizados. Da mesma forma, a recuperação de glicose como açúcar livre também foi significativamente maior na hidrólise enzimática (2,82%) do que na hidrólise térmica (0,09%). A maior presença de glicose no CHE está relacionada à ação de β -glicosidase (presente no preparado Powecell) ou ainda à ação da enzima β -glucanase (presente no preparado comercial Ultraflo[®] XL).

Embora arabinose, galactose, glicose e manose estejam presentes na composição em açúcares totais do CHE (Tabela 3.4), manose, galactose e arabinose predominam como constituintes dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática, totalizando 97 % do total de açúcares não livres (Tabela 3.5). Comparando com o produto CHT, a concentração dos açúcares não livre arabinose, glicose e galactose no produto CHE é aproximadamente 60 % inferiores. Para a manose, a concentração em açúcar não livre no CHE é menos de 20% da correspondente no CHT. Conseqüentemente, a concentração de oligossacarídeos solúveis no CHE, expressa como o total de açúcares não livres na Tabela 3.5, é cerca de um terço do valor obtido para o CHT. É importante ressaltar que o produto CHE, cuja composição está caracterizada nas Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5, corresponde ao obtido ao final de 71 h de hidrólise enzimática. Portanto, conforme já mencionado anteriormente, as enzimas presentes atuaram tanto nos biopolímeros como nos oligossacarídeos solubilizados, resultando em um produto diferenciado, contendo 55 % dos açúcares na forma livre e 45 % na forma de oligossacarídeos. Para os produtos CHT e EA, apenas 10 % dos açúcares presentes nos produtos finais estão na forma livre.

O maior teor de monossacarídeos presentes no CHE confere características desejáveis ao produto final, como a intensificação do sabor doce e a solubilização mais rápida. Por outro lado, açúcares livres são mais higroscópicos e sua presença pode favorecer a contaminação por microrganismos, fatores que podem alterar o prazo de validade do produto. Já a presença de GMs de maior massa molecular pode causar aumento de viscosidade, o que dificulta a etapa de concentração conduzida nos evaporadores. Da mesma maneira, no extrato de café comercializado na forma congelada, a menor solubilidade dos oligossacarídeos de cadeia longa leva à formação de sedimento, comprometendo a qualidade do produto (DELGADO et al., 2008). Assim, a configuração do *mix* de açúcares livres e oligossacarídeos variam de acordo com o tipo de produto que se deseja produzir. Ao contrário do processo convencional, o processo enzimático é versátil: o tempo de hidrólise e a composição do *pool* de preparados enzimáticos empregado podem

ser manipulados, facilitando os ajustes necessários para a obtenção de produtos diferenciados.

Quanto ao rendimento do processo enzimático, devido à alta produção de açúcares totais, cuja soma resulta em concentração de 22 % (Tabela 3.4), foi alcançado o valor de 18,4% em relação ao café torrado (Tabela 3.6), correspondendo a um rendimento global de 38,4 %. O rendimento na etapa de hidrólise (18,4%) é similar ao da extração térmica e reforça o potencial do processo enzimático para a produção de café solúvel. O hidrolisado obtido enzimaticamente destaca-se ainda pelas reduzidas concentrações de acetaldeído, furfural e 5-HMF presentes, cujos valores são inferiores aos obtidos até mesmo para o extrato aromático (Tabela 3.7).

3.4 - CONCLUSÕES

As novas tecnologias industriais têm procurado incorporar os princípios da Química Verde, com redução da geração de substâncias prejudiciais ao ambiente e do consumo de energia. O café solúvel disponível no mercado atualmente é obtido pelo processo Gea-Niro, no qual o rendimento é maximizado à custa de intenso consumo de energia e da degradação dos açúcares presentes.

Entre os preparados enzimáticos comerciais testados que possuem atividade para hidrolisar os polissacarídeos do café destacaram-se: Powercell (Prozyn), Galactomananase (HBI-Enzymes) e Ultraflo[®] XL (Novozymes[®]) por possuírem maior atividade enzimática para os substratos que desejamos hidrolisar.

Neste trabalho, a comparação dos produtos obtidos pelo processo tradicional e por hidrólise enzimática do café mostrou que, além do rendimento, a composição do material solubilizado é influenciada pelo processo empregado.

O produto CHT, assim como o café solúvel comercializado, apresenta composição rica em carboidratos de alta massa molecular (açúcares não livres), que favorecem a redução da adsorção de água pelo produto, que é uma característica desejada em café solúvel. Já o

produto CHE, obtido enzimaticamente, diferenciou-se dos produzidos pelo processo convencional principalmente por possuir baixas concentrações em voláteis indesejados e maiores concentrações em açúcares livres. A primeira propriedade, consequência da baixa temperatura empregada na hidrólise enzimática, é uma característica altamente valorizada no café solúvel, por impactar diretamente na qualidade do produto.

3.5 – AGRADECIMENTOS

Às empresas Tovani Benzaquen, Prozyn Biosolutions, AB Enzymes e LNF Latino América pela doação dos preparados enzimáticos utilizados no trabalho.

3.6 - REFERÊNCIAS

ABIC. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://abic.com.br>>. Acesso em: 31 maio 2013.

ADRIANO, W. S. Preparação e Caracterização de Derivados de Enzimas Industriais em Quitosana, Tese de Doutorado em Eng. Química – UFSCar, São Carlos-SP, 2008.

ARYA, M., RAO, L. J. M. An Impression of Coffee Carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47:51-67, 2007.

BOX G., HUNTER W.G. e HUNTER J. S. **Statistics for Experimenters** - An Introduction to design, data analysis, and model building, New York, John Wiley & Sons, 1978.

CLARKE, R. J., VITZHUM, O. G. **Coffee Recent Developments**, Blackwell Science, pag. 3, 2001.

DE MARIA, C. A. B., TRUGO, L. C., AQUINO NETO, F. R.; MOREIRA, R. F. A. Arabinogalactan as a potential furfural precursor in roasted coffee. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, p 559-562, 1994.

DELGADO, P.A., VIGNOLI, J.A., SIIKA-AHO, M., FRANCO, T.T. Sediments in coffee extracts: Composition and control by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, vol. 110, 168-176, 2008.

GEA-NIRO. **IC/FIC™ Batch Extractor**, em

<www.niro.com/niro/cmsdoc.nsf/webdoc/webb7nqh83>. Acesso em: 31 maio 2013.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities, **Pure and Applied Chemistry**, vol. 59, nº 2, 257-268, 1987.

ISO 3726 – **Instant Coffee – Determination of Loss in mass at 70 °C under reduced pressure**, 1983.

ISO 11292 – **Instant coffee determination of free and total carbohydrate contents – method using high performance anionic exchange chromatography (15/06/1995)**.

KASAI, N. et al. Efficient digestion and structural characteristics of cell walls of coffee beans. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6336–42, 23 ago. 2006.

LELOUP, V. LIARDON, R., Analytical Characterization of Coffee Carbohydrates, **ASIC – 15^o Colloque**, Montpellier, 863-865, 1993.

LUONTERI, E., LAINE, C., UUSITALO, S. et al. Purification and characterization of *Aspergillus* β -D-galactanases acting on β -1,4- and β -1,3/6-linked arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**, vol. 53, 155-168, 2003.

MAHAMMAD, S., CONFORT, D.A., KELLY, R.M., KHAN, S.A. Rheological Properties of Guar Galactomannan Solution during Hydrolysis with Galactomannanase and α -Galactosidase Enzyme Mixtures. **Biomacromolecules**, vol. 8, 949-956, 2007.

MAHENDRAN, T. et al. New insights into the structural characteristics of the arabinogalactan-protein (AGP) fraction of gum arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9269-76, 8 out. 2008.

MARTINS, M. C. M, SILVA, C. O., BUCKERIDGE, M. S., VIEIRA, C. C. J., Carboidratos na bebida do café preparado sob diferentes processos. **Ciênc. Tecn. Alim.** 25(2): 382-386, abr.-jun. 2005.

MÜLLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

OOSTERVELD, A., HARMSSEN, J.S., VORAGEN, A.G.J., SCHOLS, H.A., Extraction e characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea Arabica* Beans, **Carbohydrate Polymers**, 52, 285-296, 2003.

STATSOFT. INC. (2005). STATISTICA (data analysis software system). Version 7.1. www.statsoft.com.

SILVER, R. S. et al . *Enzyme-assisted soluble coffee production*, European Patent Application: 1 745 702 A1, 2005.

SIVETZ, M.; DESROSIER, N. W. **Coffee Technology**. AVI Pub. Co., 1979.

VIEGAS, M.C., BASSOLI, D. G. Utilização do Índice de Retenção Linear para Caracterização de Compostos Voláteis em Café Solúvel Utilizando GC-MS e Coluna HP-INNOWAX, **Química Nova**, Vol. 30, No. 8, 2031-2034, 2007.

VIGNOLI, J.A., BASSOLI, D.G., BENASSI, M.T. Atividades antioxidantes do café torrado e solúvel: padronização e validação de métodos, **Coffee Science**, Vol. 7, N^o 1, 68-75, 2012.

YANG, S., QIAOJUAN, Y., JIANG, Z. Biochemical Characterization of a Novel Thermostable β -1,4-Glucanase (Lichenase) from *Paecilomyces thermophila*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 5345-5351, 2008.

4 - Produção de Café Solúvel auxiliada por Enzimas

RESUMO

Para a produção de café solúvel, o café torrado é primeiramente submetido ao processo de extração a 125 °C para obter o extrato de café aromático, seguido de hidrólise térmica a 180 °C do café não solubilizado. Este segundo processo contribui para elevar o consumo de energia e formação de compostos químicos indesejados que impactam negativamente na qualidade final do produto. Neste trabalho, a hidrólise enzimática do café não extraído foi avaliada como alternativa à hidrólise térmica. Experimentos foram realizados em pH 5,0 e temperatura de 50 °C, utilizando os preparados enzimáticos comerciais Powercell (Prozyn), Galactomananase (HBI-Enzymes) e Ultrafo® XL (Novozymes®). Utilizou-se a metodologia do planejamento fatorial completo em dois níveis, para determinar o efeito de cada preparado enzimático na hidrólise dos polissacarídeos do café torrado não solubilizado na extração. Os produtos Powercell e Galactomananase apresentaram contribuições significativas ($p < 0,10$) para a hidrólise dos polissacarídeos, sendo o rendimento da melhor condição de hidrólise enzimática de 22,3%, com redução em 10 vezes na formação de voláteis indesejados.

Palavras chaves: café solúvel, extração de carboidratos, hidrólise enzimática.

4.1. INTRODUÇÃO

O café solúvel tem importante participação na pauta de exportação de países como Brasil, Colômbia, México, Vietnã e Índia, totalizando exportações de 1,8 bilhões de dólares em 2011 (ICO, 2013). O café solúvel pode ser produzido a partir das duas principais variedades de café cultivadas, o *Coffea arabica* (arábica) e o *Coffea canephora* (robusta), que correspondem a aproximadamente 70 e 30 % da produção mundial, respectivamente. As variedades de café citadas apresentam composição em carboidratos semelhante, sendo

para o café torrado (m/m): 48,1% de carboidratos, 15,9% de lipídeos, 6,8% de proteínas e 29,2% de outros compostos (OOSTERVALD et al, 2003).

As condições de torra degradam os carboidratos de menor massa molecular, restando os polissacarídeos de maior massa molecular para serem extraídos por percolação com água quente. De acordo com Arya e Rao (2007), esses polissacarídeos estão presentes na estrutura de três biopolímeros (galactomananos - GMs, arabinogalactanos - AGs e celulose), sendo constituídos pelos seguintes componentes (em base molar): 51% de manose, 21% de galactose, 16% de glicose, 6% de arabinose, 4% de ácido urônico e 1% de ramnose (OOSTERVALD et al, 2003).

As condições empregadas para obter os constituintes do café torrado na forma de sólidos solúveis são definidas em função da dificuldade em quebrar a estrutura dos biopolímeros AGs e GMs. Por outro lado, determinam o rendimento do processo assim como características dos polissacarídeos extraídos e, conseqüentemente, a qualidade do café solúvel. Os AGs são polímeros extremamente heterogêneos e estão associados com proteínas. Como mostra a Figura 4-1, sua cadeia principal é formada por ligações glicosídicas entre o carbono 1 de uma galactose e o carbono 3 da galactose vizinha, gerando um polímero $[Gal\beta-(1\rightarrow3)]_n$, com ramificações laterais do carbono 6 da galactose da cadeia principal com o carbono 1 de outra galactose, apresentando assim cadeia secundária com ligações $[Gal\beta-(1\rightarrow6)]_n$. Essas cadeias secundárias podem ainda estar ligadas a outras galactoses, ou a arabinoses que geralmente estão na parte final da cadeia polimérica (REDGWELL et al, 2002). A estrutura dos GMs, representada na Figura 4-2, é aparentemente mais simples. Sua cadeia principal é constituída por moléculas de manose unidas por ligações glicosídicas $\beta-(1\rightarrow4)$, com ramificações laterais com a galactose por ligações glicosídicas $\alpha-(1\rightarrow6)$, sendo que a razão entre manose e galactose varia nos diversos biopolímeros encontrados na natureza (MOREIRA & FILHO, 2008).

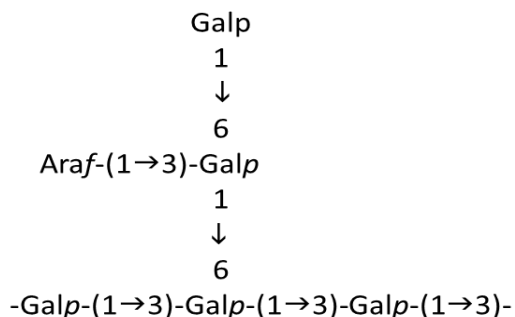


Figura 4-1: Estrutura simplificada dos AGs

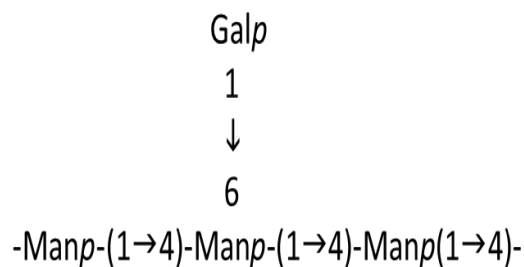


Figura 4-2: Estrutura simplificada dos GMs

A massa molecular dos AGs extraídos do café torrado está na faixa de 200 a 50.000 Da com um grau de substituição de 1 arabinose para 12 galactoses no polímero, o que permite uma boa recuperação em temperaturas próximas a 100 °C. Já a massa molecular dos GMs extraídos do café está na faixa de 200 a 80.000 Da, requerendo condições severas (180 °C) para promover a hidrólise do material e recuperação eficiente (LELOUP & LIARDON, 1993). A diferença nas condições de extração dos biopolímeros está relacionada à estrutura da parede celular do café, a qual é composta por quatro camadas, na seguinte sequência da externa para a interna: camada rica em AGs associados com proteínas, celulose rica em GMs, AGs associados com proteínas e na camada interna, GMs associados com celulose (KASAI et al, 2006).

Em processos industriais de produção de café solúvel, o café torrado é primeiramente submetido à extração com água a 125 °C para obtenção da fração solúvel denominada extrato aromático. O material não solubilizado segue então para a segunda etapa, conduzida com água a 180 °C, obtendo-se extrato de café hidrolisado termicamente. O rendimento global deste processo, considerando as duas etapas, é de 48% para o café arábica e 54% para o café robusta (GEA-NIRO, 2012). A principal vantagem deste processo é o alto rendimento. No entanto, ele apresenta um elevado consumo de energia e favorece a formação de compostos indesejáveis, provenientes da degradação de carboidratos, tais como furfural, 5-hidroxi-metil-furfural (5-HMF) e acetaldeído, devido à alta temperatura empregada na etapa de hidrólise térmica (DE MARIA et al, 1994).

Embora industrialmente a produção de café solúvel ocorra exclusivamente pelo processo térmico, o processo enzimático constitui uma alternativa promissora para a obtenção de um produto de melhor qualidade com menor consumo de energia. No processo enzimático proposto por Silver e colaboradores (2005), os grãos de café arábica previamente extraídos a 85 °C foram submetidos à hidrólise utilizando preparados comerciais (Mannaway[®] 25 L da Novozymes[®] e RS-103 da Iogen[®]), que contêm enzimas como celulasas, β -manases e β -glucanases, obtendo-se um café solúvel contendo menos de 250 mg/kg de 5-HMF.

Já no estudo realizado por Baraldi e colaboradores (2013) com grãos de café arábica torrado, os processos de extração térmica, hidrólise térmica e enzimática foram comparados, obtendo-se rendimentos de 20% e 28% para os dois primeiros. Alternativamente, o resíduo da etapa de extração térmica foi submetido à hidrólise pelos preparados enzimáticos comerciais Powercell (Prozyn Biosolutions), Galactomananase (HBI Enzymes-Japão) e Ultraflo XL (Novozymes[®]), obtendo-se um rendimento de 18% e um produto isento de 5-HMF.

A grande heterogeneidade das estruturas presentes nos biopolímeros que compõem o café justifica a utilização de preparados enzimáticos contendo uma diversidade de enzimas (celulasas, galactomananases, β -glucanases, xilanases, α -galactosidases, α -arabinosidases, etc) como estratégia para promover a hidrólise das ligações e a obtenção dos componentes do café solúvel, conforme relatado nos trabalhos de Silver et al. (2005) e Baraldi et al. (2013). Por outro lado, para a otimização do processo de extração enzimática, é fundamental identificar a contribuição efetiva de cada preparado comercial para a hidrólise.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da concentração dos preparados enzimáticos comerciais Powercell, Galactomananase e Ultraflo XL, utilizando como ferramenta o planejamento fatorial completo, juntamente com análises estatísticas ($p < 0,10$) para estabelecer a influência dos preparados enzimáticos comerciais na hidrólise

dos polissacarídeos do café e comparar com os resultados obtidos para o extrato aromático e o produto obtido por hidrólise térmica.

4.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 - Materiais

Café Torrado:

Foram utilizados grãos de café arábica, bebida dura, que foram processados em torrador batelada (Opus Gourmet, Lilla: Guarulhos, SP, Brasil) com grau de torra 7,5% (perda de massa em base seca).

Preparados Enzimáticos:

Foram empregados os preparados enzimáticos comerciais Powercell[®] (Prozyn Biosolutions), Galactomananase-HBI (HBI Enzymes-Japão) e Ultraflo[®] XL (Novozymes[®]), apresentando as seguintes atividades principais (Baraldi et al, 2013; reproduzido no Capítulo 3): Powercell – celulase e β -glucosidase; HBI – galactomananase; Ultraflo[®] XL - β - glucanase.

4.2.2 - Procedimento experimental

A estratégia experimental adotada para a realização do presente estudo está esquematizada na Figura 4.3. O café torrado e moído (CT) foi inicialmente submetido ao processo de extração com água a 125 °C, gerando como produtos o extrato aromático (EA) e resíduo da extração (RE). Para obtenção do produto final pelo processo de hidrólise térmica, o resíduo RE foi hidrolisado termicamente com água a 180 °C. As condições empregadas nas etapas de extração e hidrólise térmica estão descritas em detalhes em Baraldi et al (2013), reproduzido no Capítulo 3.

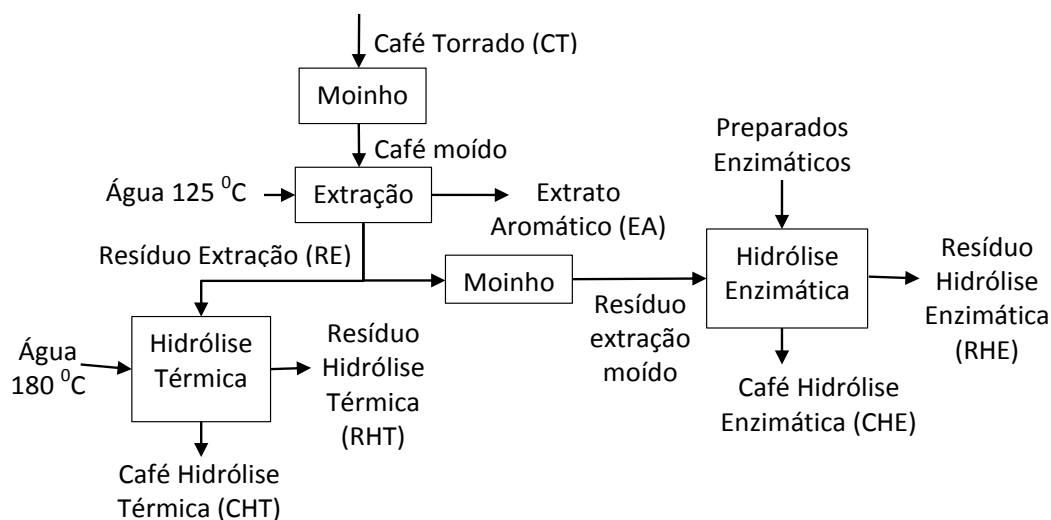


Figura 4-3: Fluxograma de obtenção de café solúvel pelos processos de extração, hidrólise térmica e enzimática.

Foram executados 11 experimentos de hidrólise enzimática, de acordo com a metodologia do planejamento fatorial completo a dois níveis e três repetições no ponto central (BOX et al, 1978), tendo como variáveis independentes as frações mássicas dos produtos Powercell, Ultraflo[®] XL e Galactomananase (massa de preparado enzimático / massa de substrato em base seca), conforme indicado na tabela 4.1, e tendo como variáveis resposta a concentração de açúcares livres, açúcares totais e rendimento da etapa. O conjunto completo de experimentos de hidrólise enzimática realizados é apresentado na tabela 4.3, incluindo as respostas avaliadas. Para a execução dos experimentos de hidrólise enzimática, o resíduo RE foi seco em estufa a 60 °C, processado em moinho de laboratório refrigerado a 5 °C (IKA[®] - modelo A10) e peneirado para obtenção de partículas menores que 500 μm (RE_{fino}). Todos os ensaios foram conduzidos em micro reator de 250 mL, sob agitação, a 50 °C, com suspensões contendo 10 g de RE_{fino} para 100 mL de tampão citrato de potássio (50 mM, pH 5,0), por um período de 15 horas, sendo o sistema resfriado a 5 °C ao final de cada ensaio.

Todos os produtos EA, CHT e CHE obtidos por extração térmica, hidrólise térmica e enzimática respectivamente, foram liofilizados e armazenados para análises posteriores de

composição em carboidratos e voláteis assim como para avaliação sensorial. As massas de material liofilizado obtidas foram ainda empregadas no cálculo do rendimento de cada processo.

Tabela 4.1: Níveis empregados no planejamento experimental e concentração correspondente das enzimas (g enzima / g substrato).

Enzimas	Níveis		
	-1	0	1
Powercell (%)	0,00	0,06	0,12
Galactomananase (%)	0,02	0,06	0,10
Ultraflo XL (%)	0,00	0,06	0,12

A faixa de concentração utilizada (Tabela 4.1) segue o utilizado por Baraldi et al. (2013) para o nível zero, e a faixa de trabalho para a Galactomananase (nível -1) iniciou-se em 0,02% porque certamente esta enzima é fundamental para hidrolisar os GMs que são os principais polissacarídeos do café, e evitou-se que exista um experimento sem adição de enzima (ensaio 1).

4.2.3 – Métodos Analíticos

4.2.3.1 - Composição em carboidratos

A composição em carboidratos (arabinose, galactose, glicose e manose), como açúcares livres ou totais, foi avaliada nos produtos EA, CHT e CHE por HPLC-PAD, utilizando o método ISO 11292 (1995). A conversão dos polissacarídeos em açúcares livres foi feita por hidrólise com HCl 1,0 M por 2,5 horas a 98 °C (300 mg de amostra para 50 mL de HCl). A composição em carboidratos dos sólidos CT, RE, RHT e RHE (Figura 3.3) também foram quantificadas como açúcares totais por HPAEC-PAD (*High Performace Anion Exchange Cromatography – Pulse Amperometric Detection*), após hidrólise com H₂SO₄ 1,0 M por 2 horas a 110 °C em autoclave (300 mg de amostra e 50 ml de H₂SO₄) (NATTORP, 2000).

4.2.3.2 - Composição em voláteis

A presença dos voláteis furfural e 5-HMF nos produtos EA, CHT e CHE foram quantificados em solução na concentração 3,0 % (m/m) por HS-SPME-GC-MS (*Head Space – Solid Phase Micro Extraction - Mass Spectrum detection*) com coluna HP-INNOVAX (VIEGAS & BASSOLI, 2007).

4.2.3.3 - Avaliação sensorial dos cafés

As amostras liofilizadas do EA e dos hidrolisados CHT e CHE foram solubilizadas em água quente (98 °C) na concentração de 1,5% (m/m). As bebidas assim produzidas foram então avaliadas por provador de café solúvel treinado à temperatura de 60 °C. A avaliação teve como fundamento o método ISO 6564:1985, na qual se realizou uma prova descritiva das bebidas de café, atribuindo-se notas entre zero (ausência) e quatro (máximo) para os sabores doce, amargo, ácido e salgado, de acordo com a escala apresentada na Tabela 4.2. Os valores de referência 4 da Tabela 4.2 foram determinados através de uma análise preliminar das amostras.

Tabela 4.2: Padrões de referência utilizados em análise

SABORES	REFERENCIAS	
	0 (zero)	4
DOCE	água mineral	Sacarose 0,5%
ÁCIDO	água mineral	ácido cítrico 0,05%
SALGADO	água mineral	NaCl 0,1%
AMARGO	água mineral	Cafeína 0,20%

4.2.4 - Procedimentos de Cálculo

Os rendimentos (R) dos processos de extração, hidrólises térmica e enzimática foram determinados pela equação 4.1 em função da massa de sólidos solúveis produzidos.

$$R = \frac{m_L}{m_{CT}} \times 100 \quad (4.1)$$

onde: m_L é a massa de produto liofilizado e m_{CT} é a massa inicial de café (CT) processado, em base seca.

Além do rendimento, realizou-se o balanço material global e por componente para os processos estudados, o qual está representado pela grandeza Recuperação (Rec). A recuperação em termos do balanço material global (Rec_G , Equação 4.2) foi baseada nas massas de sólidos quantificadas (em base seca) no início e no final da etapa (i) de extração, hidrólise térmica ou enzimática (Figura 4.3). Analogamente, a recuperação em termos do balanço por componente (Rec_j , Equação 4.3) foi estabelecida em função das massas dos açúcares arabinose, galactose, glicose e manose presentes nos sólidos no início de cada etapa e recuperadas nos respectivos produtos.

$$Rec_G = \frac{\sum_{i=1}^n m_{fin}^i}{\sum_{i=1}^n m_{in}^i} \times 100 \quad (4.2)$$

$$Rec_j = \frac{\sum_{i=1}^n m_{fin}^i x_{j_fin}}{\sum_{i=1}^n m_{in}^i x_{j_in}} \times 100 \quad (4.3)$$

onde: m_{in}^i – massa de sólidos (base seca) no início da etapa i (massa de CT para a extração; massa de RE para a hidrólise térmica e RE_{fino} para a enzimática); m_{fin}^i – massa de sólidos (base seca) no final da etapa i (massas de EA e RE para a extração; massas de CHT e RHT para a hidrólise térmica e massas de CHE e RHE para a hidrólise enzimática); x_{j_in} – fração mássica do componente (j) no sólido adicionado no início da etapa i; x_{j_fin} – fração mássica do componente (j) nos sólidos recuperados ao final da etapa i; j – açúcares arabinose, galactose, glicose ou manose. A determinação dos valores de x_{j_in} ou x_{j_fin} em CT, RE, RHT, RHE, CHT e CHE foi feita conforme descrito em 4.2.3.1, em açúcares totais.

4.2.5 - Análise Estatística do Planejamento Fatorial

Para a estimativa dos efeitos correspondentes a cada fator (concentração do respectivo preparado enzimático) nas 9 respostas estudadas (rendimento, composição dos hidrolisados em manose, glicose, galactose e arabinose livres, composição dos hidrolisados em manose, glicose, galactose e arabinose totais), os dados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática foram tratados utilizando o software STATISTICA[®] 7.1 (STATSOFT. INC., 2005). Para a análise dos efeitos, foram considerados significativos aqueles que apresentaram p-valor $\leq 0,1$.

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

O desempenho dos diferentes preparados enzimáticos na hidrólise do resíduo da extração está analisado na seção 4.3.1. Nos demais subitens, o café solúvel produzido enzimaticamente foi comparado com os produtos EA e CHT, obtidos pelos processos convencionais, em termos de rendimento, recuperação e composição em carboidratos.

4.3.1 - Avaliação da ação dos diferentes preparados enzimáticos na hidrólise dos polissacarídeos do café

Os principais resultados dos onze experimentos de hidrólise enzimática do resíduo da extração (RE), executados de acordo com o planejamento fatorial completo proposto, são sintetizados na Tabela 4.3.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 4.3, observa-se que os maiores valores para o rendimento foram obtidos no ensaio 8, no qual todos os preparados enzimáticos foram adicionados na maior concentração (nível +1, Tabela 4.2). Já os menores rendimentos (Experimentos 1, 2, 5 e 6) ocorreram em condições de baixa concentração de enzimas, especialmente de Powercell.

Tabela 4.3: Concentrações de preparados enzimáticos (em fração mássica) empregados nos ensaios de hidrólise enzimática e resultados obtidos em termos de rendimento (R) e composição dos hidrolisados obtidos em açúcares livres e totais (% m/m).

Ensaio	Variáveis Independentes			Variáveis Respostas								
	Galactomananase (%)	Powercell (%)	Ultraflo XL (%)	R (%)	Açúcar Livre (%)				Açúcar Total (%)			
					ARA	GAL	GLI	MAN	ARA	GAL	GLI	MAN
1	0,02	0,00	0,00	18,5	0,3	0,2	0,5	2,9	2,6	8,0	0,8	5,5
2	0,10	0,00	0,00	17,0	0,7	0,5	1,1	5,2	2,9	8,6	1,5	8,4
3	0,02	0,12	0,00	20,7	1,6	0,5	2,3	3,7	3,5	8,5	2,8	9,0
4	0,10	0,12	0,00	21,9	1,6	0,7	2,5	5,9	3,4	8,3	3,1	10,7
5	0,02	0,00	0,12	18,2	0,3	0,2	0,6	3,2	3,2	8,7	1,0	7,5
6	0,10	0,00	0,12	19,0	0,6	0,4	1,1	4,9	3,1	8,6	1,6	9,0
7	0,02	0,12	0,12	21,3	1,6	0,5	2,2	3,6	3,7	8,6	2,9	10,2
8	0,10	0,12	0,12	22,3	1,6	0,7	2,5	5,7	3,8	8,8	3,4	12,0
9	0,06	0,06	0,06	21,9	1,4	0,6	1,9	4,9	3,5	8,5	2,5	10,6
10	0,06	0,06	0,06	21,1	1,4	0,6	2,1	5,2	3,7	8,8	2,7	11,1
11	0,06	0,06	0,06	19,1	1,4	0,7	2,1	5,1	4,5	10,3	3,3	12,6

A Figura 4.4 foi construída a partir dos resultados da análise estatística e permite uma avaliação mais rigorosa da eficiência dos diferentes preparados enzimáticos na hidrólise dos polissacarídeos presentes no RE. Em termos de liberação de açúcares livres, observa-se que Powercell apresenta efeitos significativos na formação de glicose e arabinose (Figura 4-4a), enquanto Galactomananase é o preparado mais eficiente para a produção de manose (Figura 4-4b). A contribuição do preparado Ultraflo® XL para a produção de qualquer açúcar livre ou total não foi estatisticamente significativa ($p > 0,49$). Já para a resposta “açúcares totais”, apenas a formação dos açúcares glicose e manose sob efeito do preparado Powercell foi significativa (Figura 4-4d). Além disso, somente o preparado Powercell apresentou efeito significativo sobre o rendimento (Figura 4-4c) como consequência da contribuição efetiva das enzimas presentes nesse preparado para a liberação de oligossacarídeos contendo glicose e manose.

Os resultados obtidos estão coerentes com as atividades enzimáticas esperadas para os preparados comerciais empregados neste trabalho (Tabela 4.1) e mostram que as enzimas presentes atuam sobre os polissacarídeos presentes no RE, promovendo sua

degradação. O preparado Powercell apresenta atividade enzimática principal em celulases e secundária de 1,4- α -arabinosidase, o que explica sua eficiência na produção de glicose e arabinose (Figuras 4-4a e 4-4c). Já o preparado Galactomananase possui atividade principal em 1,4- β -mananase, o que explica o efeito mais acentuado na produção de manose (Figuras 4-4b e 4-4d). No entanto, os preparados Powercell e Galactomananase tiveram efeitos pequenos na liberação de galactose (Figura 4-4a e 4-4b), possivelmente possuindo ação somente sobre as galactoses existentes no GMs (ação da α -galactosidase). Isso indica deficiência em enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α ou β envolvendo galactose presentes nos AGs (galactanases) nos preparados enzimáticos testados.

O desempenho dos três processos estudados para a obtenção do produto “café solúvel” foi avaliado estimando-se os valores do rendimento (Equação 4.1) e da recuperação (Equações 4.2 e 4.3). Para o processo de hidrólise enzimática, escolheu-se condição estudada que levou aos melhores resultados (Ensaio 8, Tabela 4.3) para a comparação com os processos de extração e hidrólise térmica. A partir dos valores apresentados na Tabela 4.4, observa-se que o rendimento da hidrólise enzimática é similar ao obtido no processo de extração a 125 °C, sendo ambos cerca de 37 % inferiores ao valor observado na hidrólise térmica. Esse resultado já era esperado, tendo em vista a alta temperatura empregada na hidrólise térmica (180 °C).

Tabela 4.4: Rendimentos dos processos de extração, hidrólise térmica e enzimática

PROCESSO	RENDIMENTO (%)
Extração	20,0 \pm 0,3
Hidrólise Térmica	35 \pm 3
Hidrólise Enzimática	22 \pm 3*

*Ensaio 8 do delineamento experimental (Tabela 4.3)

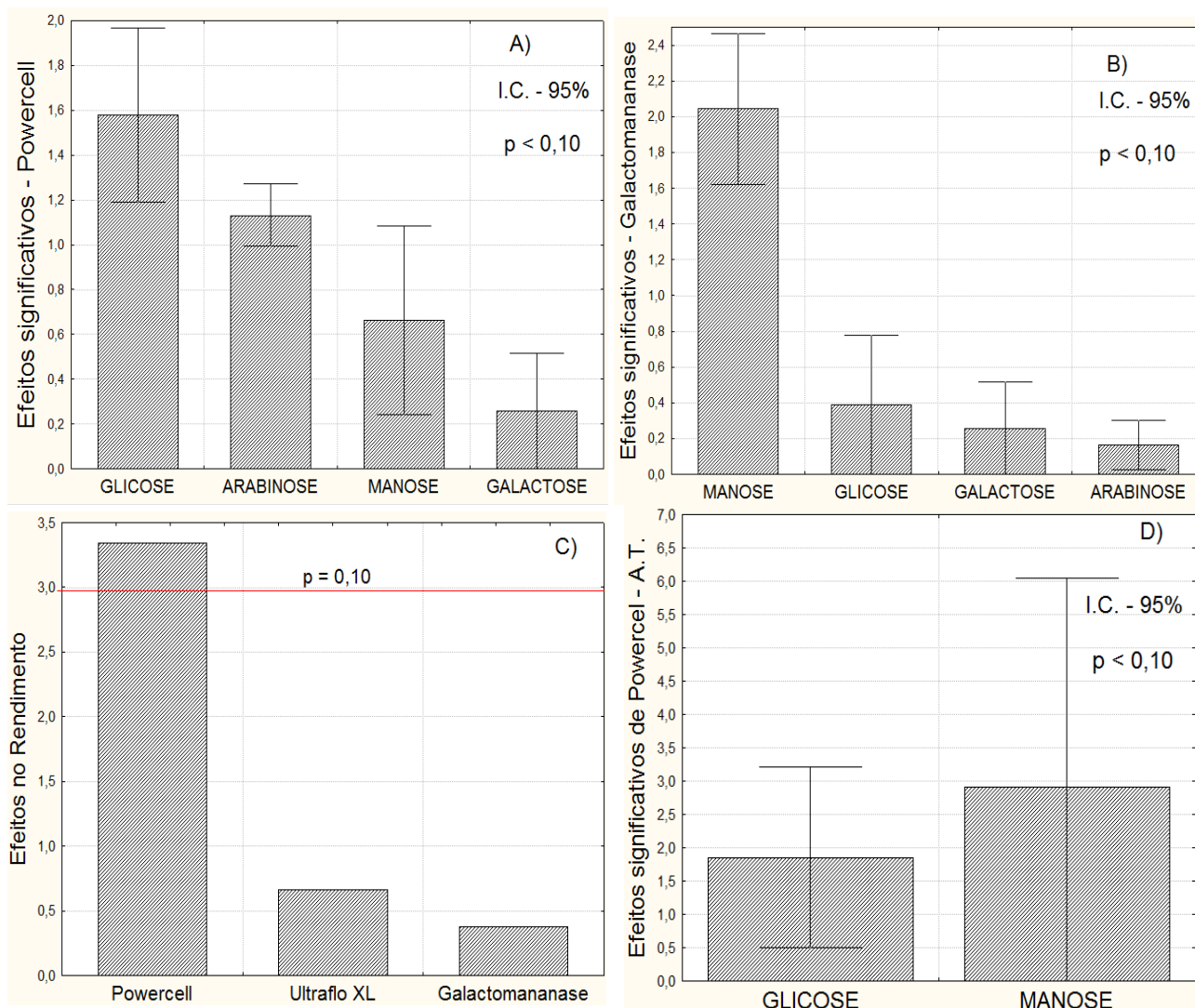


Figura 4-4: Preparados enzimáticos e influência na produção de açúcares e rendimento das hidrólises. a) Efeitos do preparado Powercell na produção de açúcares livres; b) Efeitos do preparado Galactomananase na produção de açúcares livres; c) Efeitos dos diferentes preparados enzimáticos no rendimento (Equação 4.3); d) Efeitos dos preparados enzimáticos Powercell e Galatomananase na produção de oligossacarídeos contendo glicose e manose como açúcares totais (A.T.). Barras representam o erro

4.3.2 - Avaliação do desempenho dos processos de extração, hidrólise térmica e enzimática.

A Tabela 4.5 apresenta as estimativas da recuperação baseadas no balanço material global para os sólidos fornecidos e gerados (Equação 4.2) nos 3 processos estudados. Destaca-se que, em todos os casos, a massa de produtos obtida foi consistente com a massa de matéria-prima empregada em cada processo.

Tabela 4.5: Recuperação calculada a partir balanço global para os sólidos.

PROCESSO	INÍCIO (g)		FINAL (g)		RECUPERAÇÃO (%)
Extração	CT	2.174	EA	435	99
			REA	1.717	
Hidrólise Térmica	RE	1.717	CHT	613	101
			RHT	1124	
Hidrólise Enzimática (Experimento 8)	RE	20,00	CHE	4,14	102
			RHE	16,30	

CT: Café Torrado, RE: Resíduo da Extração, EA: Extrato Aromático, REA: Resíduo da Extração Aromática, CHT: Café Hidrólise Térmica, RHT: Resíduo da Hidrólise Térmica, CHE: Café Hidrólise Enzimática, RHE: Resíduo da Hidrólise Enzimática.

Para avaliar a recuperação para os principais carboidratos presentes no produto, as composições dos materiais sólidos CT, RE, RHT e RHE (tabela 4.6) e dos cafés (EA, CHT e CHE produzidos (Tabela 4.7) foram determinadas. A partir da aplicação da Equação 4.3, das composições e das massas envolvidas em cada processo (Tabela 4.5), foi calculada a recuperação de cada componente analisado (Tabela 4.8).

Tabela 4.6: Composição (açúcares totais) em carboidratos dos materiais sólidos

(%m/m)	CT	RE	RHE*	RHT
Arabinose	3,3	3,2	2,8	2,1
Galactose	9,4	10,1	9,8	3,5
Glicose	7,3	8,8	9,7	13,1
Manose	20,2	24,6	25,9	28,5
Carboidratos Totais	41,3	48,3	49,9	47,7

* Experimento 8, Tabela 4.3. CT: Café Torrado, RE: Resíduo da Extração, RHE: Resíduo da Hidrólise Enzimática, RHT: Resíduo da Hidrólise Térmica.

Tabela 4.7: Composição (açúcares totais) em carboidratos dos produtos EA, CHT e CHE

Açúcares totais (%)	EA	CHT	CHE*
Arabinose	3,1 ± 0,5 ^b	4,6 ± 0,4 ^a	3,8 ± 0,6 ^{a,b}
Galactose	2,6 ± 0,4 ^c	20,1 ± 2,4 ^a	8,8 ± 1,2 ^b
Glicose	1,53 ± 0,04 ^b	0,7 ± 0,1 ^c	3,4 ± 0,5 ^a
Manose	0,9 ± 0,3 ^b	10,4 ± 0,8 ^a	12,0 ± 1,3 ^a

* Experimento 8, Tabela 4.3. Média ± I.C. a 95% para n=3. EA: Extrato Aromático, CHT: Café Hidrólise Térmica, CHE: Café Hidrólise Enzimática. Teste de Tukey aplicado nas linhas sendo os grupos homogêneos (p < 0,05) ordenados em ordem decrescente

Novamente, a Tabela 4.8 mostra a excelente recuperação para a maioria dos carboidratos. O menor valor (92%) para o *pool* carboidratos da hidrólise térmica está relacionado à perda de carboidratos e proteínas na forma de voláteis gerados devido à degradação térmica.

Tabela 4.8: Recuperação para os açúcares arabinose, galactose, glicose e manose calculada a partir balanço por componente e balanço para os carboidratos totais.

PROCESSO	COMPONENTES	INÍCIO (g)	FINAL(g)	RECUPERAÇÃO (%)
EXTRAÇÃO	Arabinose	70,6	67,6	96
	Galactose	204,8	184,3	90
	Glicose	158,5	158,3	100
	Manose	439,1	426,0	97
	Carboidratos Totais	897,8	866,1	96
HIDRÓLISE TÉRMICA	ARABINOSE	54,2	52,3	96
	GALACTOSE	173,0	162,6	94
	GLICOSE	151,6	151,2	100
	MANOSE	422,3	384,2	91
	CARBOIDRATOS	829,8	759,4	92
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA*	ARABINOSE	0,63	0,61	96
	GALACTOSE	2,02	1,97	98
	GLICOSE	1,77	1,69	96
	MANOSE	4,92	4,67	95
	CARBOIDRATOS	9,67	9,23	95

*Experimento 8, Tabela 4.3.

4.3.3 - Caracterização dos produtos EA, CHT e CHE

Os produtos EA, CHT e CHE obtidos ao final de cada processo foram comparados quanto à composição em carboidratos e voláteis assim como em características sensoriais. Os principais resultados são analisados a seguir.

4.3.3.1 - Composição em Carboidratos

A composição em carboidratos é um importante fator já que estes são os principais compostos presentes no café torrado e justamente os que precisam ser eficientemente

recuperados a partir da matéria-prima para a produção de café solúvel, determinando o rendimento do processo. A composição em carboidratos é também empregada para identificar possíveis adulterações no produto café solúvel, cujos critérios que definem a autenticidade do café solúvel estão definidos na norma ISO 24.114 (2011). A composição em termos de açúcares totais foi fornecida na Tabela 4.7 e a correspondente, em açúcares livres, é dada na Tabela 4.9.

Analisando a Tabela 4.7, verifica-se que o hidrolisado produzido enzimaticamente apresenta composição em arabinose, glicose e manose similares ou até superiores a dos produtos obtidos pelos processos convencionais. No entanto, a formação de galactose é inferior a do CHT, o que está provavelmente relacionado à baixa afinidade das enzimas presentes nos preparados comerciais testados pelas ligações entre galactoses nos AGs. Já a Tabela 4.9 mostra que a presença de açúcares livres é acentuada no hidrolisado enzimático, o qual apresenta teores de manose e glicose significativamente superiores aos dos demais produtos. Esse desempenho superior é explicado pelas atividades em celulases e galactomananases presentes nos preparados enzimáticos. Observa-se também que a formação de arabinose como açúcar livre é maior na hidrólise térmica, porém existe atividade enzimática para solubilizar arabinose no preparado enzimático Powercell (Figura 4-4a) indicando que o preparado enzimático não consegue acessar a arabinose extraída por hidrólise térmica (impedimento espacial).

Tabela 4.9: Composição (açúcares livres) em carboidratos dos produtos EA, CHT e CHE

Açúcares livres (%)	EA	CHT	CHE*
Arabinose	0,25 ± 0,07 ^c	2,3 ± 0,5 ^a	1,6 ± 0,1 ^b
Galactose	0,04 ± 0,01 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,2 ^a
Glicose	0,03 ± 0,00 ^c	0,09 ± 0,02 ^b	2,7 ± 0,3 ^a
Manose	0,04 ± 0,00 ^c	0,4 ± 0,1 ^b	5,7 ± 0,3 ^a

*Experimento 8, Tabela 4.3. Média ± I.C. a 95% para n=3, EA: Extrato Aromático, CHT: Café Hidrólise Térmica, CHE: Café Hidrólise Enzimática. Teste de Tukey aplicado às linhas, e grupos homogêneos (p < 0,05) ordenados do maior para o menor.

4.3.3.2 - Composição em Voláteis

O café é apreciado pelo seu aroma, cujos componentes são gerados durante a etapa de torra. Porém, a etapa de hidrólise térmica conduzida em altas temperaturas gera compostos provenientes da degradação de carboidratos que conferem características desagradáveis ao produto. Como mostra a Tabela 4.10, a produção de voláteis está diretamente associada com as condições empregadas no processo de extração/hidrólise do café, sendo muito superior para os indesejáveis, no produto obtido por hidrólise térmica do que no extrato aromático ou no hidrolisado enzimático.

Tabela 4.10: Composição de voláteis dos cafés solúveis obtidos pelos diferentes processos.

Voláteis (ppb)	EA	CHT	CHE*
Acetaldeído	5.533 ± 221 ^b	14.733 ± 453 ^a	1.307 ± 95 ^c
Furfural	24.133 ± 482 ^b	48.900 ± 733 ^a	5.314 ± 241 ^c
5-HMF	667 ± 26 ^c	2.667 ± 105 ^a	840 ± 32 ^b

*Experimento 8, Tabela 4.3. Média ± I.C. a 95% para n=3, EA: Extrato Aromático, CHT: Café Hidrólise Térmica, CHE: Café Hidrólise Enzimática. Teste de Tukey aplicado às linhas, que foram ordenadas em ordem decrescente de grupos homogêneos ($p < 0,05$).

4.3.3 - Análise sensorial dos produtos EA, CHT e CHE

A análise sensorial é uma metodologia plenamente estabelecida e largamente aplicada na avaliação de alimentos e bebidas como o café (FERREIRA et al, 2000). No presente estudo, essa metodologia foi empregada na comparação dos produtos obtidos pelos diferentes processos e os resultados são mostrados na tabela 4.11. O EA apresenta um equilíbrio entre acidez e amargor, tendo características de café torrado e moído preparado da forma tradicional (coador). O CHT apresenta forte acidez e características aromáticas desagradáveis, descritas como notas químicas. E, finalmente, o CHE apresenta um sabor doce um pouco mais intenso, associado à maior quantidade de glicose livre (tabela 4.9), mas contrastando com um amargo mais intenso que possivelmente está associado à hidrólise de proteínas por proteases presentes nos preparados enzimáticos.

Tabela 4.11: Resultados das análises sensoriais para os produtos EA, CHT e CHE

CAFÉ LIOFILIZADO	DOCE	ÁCIDO	AMARGO	SALGADO
EA	1	0	1	0
CHT	0	3	2	0
CHE*	2	1	4	0

Experimento 8, Tabela 4.3, Padrões de 0 a 4 estabelecido na Tabela 4.2. EA: Extrato Aromático, CHT: Café Hidrólise Térmica, CHE: Café Hidrólise Enzimática.

O EA é o padrão reconhecido como de melhor café por ser similar ao café de coador (padrão reconhecido pelo consumidor), enquanto o CHT apresenta forte acidez e o CHE forte amargor.

Nesse contexto, avaliou-se no presente estudo a hidrólise enzimática como processo alternativo para a produção de café solúvel. O processo proposto se mostrou promissor em termos de qualidade do produto, com baixa formação dos voláteis acetaldeído, furfural e 5-HMF, resultando em bom desempenho do hidrolisado enzimático na análise sensorial, o qual apresentou aroma neutro e boa composição em carboidratos. Associada aos processos tradicionais em uma instalação industrial operada de maneira flexível, a produção de parte do café solúvel por hidrólise enzimática contribuiria ainda para reduzir o consumo de energia e o impacto ambiental, já que é realizada em temperatura baixa (50 °C).

O estudo da etapa de hidrólise enzimática pela metodologia de planejamento experimental revelou ainda que as mananases e celulasas presentes nos preparados enzimáticos Powercell e Galactomananase foram eficientes na produção de carboidratos contendo glicose, manose e arabinose, o que comprova a presença de enzimas com afinidade pelos biopolímeros celulose e GMs. Entretanto, as galactanases presentes nesses preparados não apresentaram boa afinidade pelos AGs (biopolímeros com a cadeia principal de galactose). Por isso, os dados da composição em açúcares totais mostram que a galactose está presente em teor 50 % inferior no hidrolisado enzimático, em comparação com a concentração presente no hidrolisado térmico. Essa diferença é a principal responsável pelo menor rendimento do processo enzimático (22,3 %), que resulta em um rendimento global de aproximadamente 42 %, em associação com a etapa de extração a 125 °C. O custo estimado da Powercell e Galactomananase é de aproximadamente US\$200,00/kg (valor dependente da quantidade adquirida). Embora o valor seja alto, como a quantidade usada na hidrólise é pequena, estima-se um aumento de custo de R\$ 2,20/kg de café solúvel produzido.

4.4 - CONCLUSÕES

A produção mundial de café solúvel é baseada no processo consagrado GEA-NIRO, consistindo em uma etapa de extração, seguida por uma etapa de hidrólise térmica. Esse processo foi concebido com o objetivo de maximizar o rendimento global em sólidos solúveis, que pode atingir 48 % para o café arábica. Mais recentemente, a síntese de processos industriais passou a incorporar novos objetivos, incluindo a minimização do impacto ambiental e do consumo de energia, o aumento da qualidade do produto e a flexibilização da planta, além do aumento de rendimento.

Os preparados enzimáticos comerciais Powercell e Galactomananase contribuem significativamente ($p < 0,10$) na hidrólise enzimática do substrato resíduo de extração do café torrado, liberando os constituintes dos polissacarídeos como açúcares livres, enquanto o preparado Ultraflo[®] XL não apresentou efeitos significativos ($p < 0,10$).

Quando comparamos o rendimento da hidrólise térmica com a hidrólise enzimática, observamos que o rendimento foi reduzido de 35 % para 22%, sendo que maior parte desta diferença explica-se que na hidrólise térmica 20,1% de galactose é solubilizada como açúcares totais, enquanto na hidrólise enzimática este valor é somente 8,8%, indicando que um preparado enzimático capaz de hidrolisar ligações entre as galactoses se faz necessário.

Por outro lado à hipótese de produzir um café solúvel com reduzido teor de voláteis indesejados por hidrólise enzimática foi confirmada, onde os teores de acetaldeído, furfural e 5-HMF foram inferiores aos dos produtos solubilizados por hidrólise térmica.

A presença de sabor amargo, provavelmente proveniente da hidrólise de proteínas presentes na estrutura do café por proteases encontradas nos preparados enzimáticos, juntamente com a baixa produção de galactose constituem as principais limitações do processo enzimático. Considerando que os preparados testados são recomendados para o processamento de lignocelulósicos (Powercell) ou de sucos, bebidas (Ultraflo[®] XL) e redução de viscosidade em extrato de café (Galactomananase), o desenvolvimento de complexos enzimáticos *tailor-made* para a hidrólise do resíduo da extração se apresenta como uma possível solução para o aumento de rendimento do processo enzimático.

Agradecimentos:

As empresas Tovani Benzaquen, Prozyn Biosolution e Novozymes pela doação de enzimas e à Café Iguaçu pelo uso das instalações e equipamentos.

4.5 - REFERÊNCIAS:

ALVES, R., CASAL, S. & OLIVEIRA, B. (2009), Benefícios do Café na Saúde: Mito ou Realidade, **Química Nova**, **32**, 2169-2180.

ARYA, M., & RAO, L. J. M. (2007) An Impression of Coffee Carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, **47**,51-67.

BARALDI, I. J., GIORDANO, L. R. C., ZANGIROLAMI, T. C., Análise Comparativa da Hidrólise do Café Torrado por Tratamentos Térmico e Enzimático, **Coffee Science**. SUBMITTED, 2013.

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G. & HUNTER, S. J. (1978) **Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building**. Wiley. New York.

DE MARIA, C. A. B. et al. Arabinogalactan as a potencial furfural precursor in roasted coffee. **International Journal of Food Science And Technology**, v. 29, p. 559–562, 1994.

CLARKE, R. J. & VITZHUM, O. G.(2001). **Coffee Recent Developments**, Blackwell Science, Pp. 3.

FERREIRA, V. L. P. et al (2000), **Análise Sensorial**: testes discriminativos e afetivos, Campinas-SP: SBCTA.

GEA-NIRO (2012). *IC/FIC™ Batch Extractor*, em <<http://www.niro.com/niro/cmsdoc.nsf/webdoc/webb7nqh83>>. Accessed 28 jan. 2012.

ICO (2013). *Statistics of Coffee*. Disponível em <<http://www.ico.org/historical/2000+/PDF/CONSUMPTION.pdf>>. Accessed 20 jan. 2013.

ISO 11292 (1995) – *Instant coffee determination of free and total carbohydrate contents – method using high performance anionic exchange chromatography (15/06/1995)*.

ISO 6564 (1985). *Sensory analysis – Methodology – Flavor profile methods*.

ISO 24144 (2011) – Instant Coffee: Criteria for Authenticity.

KASAI, N., KONISHI, A., IWAI, K. & MAEDA, G.(2006). Efficient Digestion and Structural Characteristics of Cell Walls of Coffee Beans, **J. Agr. Food Chem.**, 54, 6336-6342.

LELOUP, V., & LIARDON, R. (1993), **ANALYTICAL CHARACTERIZATION OF COFFEE CARBOHYDRATES**, *ASIC, 15e Colloque*, Montpellier, Pp. 863 – 865.

MARTINS, M. C. M., SILVA, C. O., BUCKRIDGE, M. S., & VIEIRA, C. C. J. (2005), Carboidratos na bebida de café preparado sob diferentes processos, **Cienc. Tecnol. Alim.**, 25, 382-386.

MOREIRA, L. R. S. & FILHO, E. X. F.(2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems, **Appl Microbiol Biotechnol**, 79, 165-178.

MÜLLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31, 426-428, 1959.

NATTORP, A. (2000). **Kinetics of the Hydrolysis of Mannan in Plant Materials and in Solution**. *Experimental Study and Mathematical Modeling*. D. Sc. thesis, EPFL, Lausanne: Switzerland, Pp 137-138.

OOSTERVELD, A., HARMSSEN, J.S., VORAGEN, A.G.J. & SCHOLS, H.A. (2003). Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* Beans, **Carbohydrate Polymers**, 52, 285-296.

REDGWELL, R. J., CURTI, D., FISCHER, M., NICOLAS, P. & FAY, L. B. (2002). Coffee bean arabinogalactans: acid polymers covalently linked to protein, **Carbohydrate Research**, 337, 239-253.

SILVER, R. S. et al. (2005). *Enzyme-assisted soluble coffee production*, **European Patent Application**: 1 745 702 A1.

SIVETZ, M., & DESROSIER, N. W. (1979). *Coffee Technology*, AVI Publishing-USA, Pp. 552-553.

STATSOFT.INC. (2005). STATISTICA® (data analysis software system).Version 7.1.
www.statsoft.com.

VIEGAS, M. C. & BASSOLI, D. G.(2007). Utilização do Índice de Retenção Linear para Caracterização de Compostos Voláteis em Café Solúvel Utilizando GC-MS e Coluna HP-INNOWAX, **Química Nova**, **30**, 2031-2034.

VIGNOLI, J. A., BASSOLI, D. G., & BENASSI, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, **124**, 863-868.

5 – Combinação de Processo Térmico e Enzimático na Extração de Café Solúvel.

5.1 – INTRODUÇÃO

No Capítulo 3 observou-se que todos os preparados enzimáticos testados apresentaram ausência ou baixa atividade de galactanases (substrato goma arábica-Sigma). Na tabela 4.7 também se observou a baixa concentração de galactose total (8,8%) no produto obtido por hidrólise enzimática (CHE), quando comparada com os 20,1% do produto obtido por hidrólise térmica (CHT). Fica evidente, portanto, a deficiência dos preparados enzimáticos comerciais testados em extrair a galactose do substrato café torrado.

A existência de enzimas que hidrolisam cadeias de galactoses não redutoras (E.C. 3.2.1.23) foi detectada em frutos de café durante período de maturação, sendo responsáveis pelo abrandamento da parede celular neste período. Os genes que codificam a expressão destas enzimas foram identificados, possibilitando a produção destas enzimas em *Escherichia coli* utilizando técnicas de Biologia Molecular (FIGUEIREDO; LASHERMES; ARAGÃO, 2011). Porém preparados enzimáticos comerciais com esta atividade não foram encontrados nos estudos anteriores (Capítulos 3 e 4).

A dificuldade das enzimas presentes nos preparados enzimáticos comerciais em hidrolisar os polissacarídeos contendo galactoses pode também estar relacionada à presença de regiões de difícil acesso no tecido vegetal. A temperatura empregada na etapa de extração térmica (assim como na de hidrólise térmica) tem um papel importante na modificação da estrutura do tecido vegetal e seu aumento pode contribuir para facilitar o acesso das enzimas. Por outro lado, o aumento da temperatura pode favorecer a formação dos compostos indesejáveis como o furfural, que é gerado por degradação térmica da arabinose (DE MARIA et al., 1994), comprometendo a qualidade do extrato aromático. Assim, decidiu-se realizar um estudo da influência da temperatura de extração térmica, monitorando a formação dos voláteis indesejados (furfural, acetaldeído e 5-HMF) na bebida. Após identificar a temperatura ótima para a realização da extração térmica (temperatura limite para a ocorrência de reações de degradação), efetuou-se a extração térmica do café torrado (CT) nesta nova temperatura substituindo o valor de 125 °C utilizado nos capítulos 3 e 4 e repetindo os experimentos de hidrólise térmica e hidrólise enzimática com o resíduo da extração térmica assim obtido (Figura 4.3).

Além da comparação dos carboidratos livres e totais (Capítulo 3 e 4), comparou-se também os aminoácidos dos cafés obtidos pelos diferentes processos, com o objetivo de verificar se existe alguma relação entre os aminoácidos e os sabores amargos detectados na avaliação sensorial.

Outra característica importante do café solúvel é a massa molecular dos materiais obtidos pelos diferentes métodos, que está relacionada com as propriedades do produto como: solubilidade, higroscopia e temperatura de transição vítrea (T_g). Leloup & Liardon (1993) determinaram em extrato de café arábica a presença de AGs com massa molecular de 200 a 50.000 Da e GMs com massa molecular de 200 a 80.000 Da, utilizando de cromatografia de permeação em gel (GPC). Uma outra metodologia empregada para estimar a massa molecular média dos cafés produzidos foi proposta por Beer, Wood e Weisz (1999), que estabeleceram correlações baseadas no modelo de Mark-Houwink-Sakurada entre a massa molecular de GMs em solução aquosa (determinada por GPC) e a viscosidade intrínseca da solução deste biopolímero, a 25 °C (equação 5.1).

$$[\mu] = K \cdot (MM)^\alpha \quad (5.1)$$

Onde:

$[\mu]$: é a viscosidade intrínseca em dL/g, definida pela equação 5.2;

K : constante que, para os GMs, foi determinada como $5,13 \times 10^{-4}$ dL/g;

MM : massa molecular em g/mol ou Daltons (Da);

α : constante que, para os GMs, foi determinada como 0,72.

A viscosidade intrínseca é definida como a viscosidade de uma solução infinitamente diluída, como indica a equação 5.2 (BEER; WOOD; WEISZ, 1999).

$$[\mu] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\mu_{esp}}{c} \quad (5.2)$$

Onde:

C : Concentração do soluto em g/dL;

μ_{esp} : viscosidade específica da solução calculada pela equação 5.3.

$$\mu_{esp} = \frac{\mu_{solução} - \mu_{solvente}}{\mu_{solvente}} \quad (5.3)$$

Onde:

$\mu_{solução}$: viscosidade da solução medida diretamente em viscosímetro;

$\mu_{solvente}$: viscosidade da água que é 0,89 cP (25 °C).

Na prática, a viscosidade intrínseca $[\mu]$ é determinada pela equação de Schultz-Blasche (equação 5.4), sendo $[\mu]$ o coeficiente linear da equação 5.4 ajustada por regressão linear para os dados de $[\mu_{esp}/C]$ em função da $[\mu_{esp}]$ (BEER; WOOD; WEISZ, 1999).

$$\left(\frac{\mu_{esp}}{C}\right) = [\mu] + [\mu] \cdot K_{SB} \cdot \mu_{esp} \quad (5.4)$$

Onde:

K_{SB} : Constante de Schultz-Blasche que depende da temperatura, solvente e soluto.

Quando a viscosidade da solução polimérica se comporta como um fluido newtoniano, a regressão linear para ajustar os dados experimentais à equação (5.4) apresenta coeficiente de correlação perto de um (BEER; WOOD; WEISZ, 1999).

Para finalizar os estudos efetuou-se avaliação sensorial dos três produtos obtidos (EA, CHT e CHE), observando-se o impacto na qualidade dos produtos por extração térmica, hidrólise térmica e hidrólise enzimática das modificações nas condições de operação da extração térmica.

5.2- MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 - Materiais:

Café Arábica (Iguaçu Espresso) com grau de torra médio (perda de massa de 7,5% em base seca), moído com diâmetro de partículas entre 0,5 mm e 2,0 mm (CT). Enzimas: Powercell (cortesia da Prozyn) e Galactomananase (HBI-Enzymes).

5.2.2 - Procedimentos Experimentais

5.2.2.1 - Determinação da Temperatura Ótima de Extração

O café torrado (CT) foi submetido primeiramente à extrações sucessivas com água quente, em ciclos de 30 minutos, utilizando fator de extração 3,0 (produzido 3,0 kg de extrato para 1,0 kg de café torrado) nas temperaturas de 120 °C, 130 °C, 150 °C, 160 °C, 165 °C, 170 °C e 175 °C para a identificação da temperatura ótima de extração (TOE), que é a mínima temperatura na qual aumentamos a solubilização de galactose. Utilizou-se fator de extração neste experimento, pois em experimentos preliminares verificou-se que com este fator a concentração de sólidos solúveis no final da extração tende ao valor zero, ou seja, extrai-se o máximo do café torrado em cada perfil de temperatura.

5.2.2.2 - Extração Térmica

O café torrado (CT) foi então submetido à extração em um conjunto de 4 colunas extratoras em série, com água de alimentação na temperatura (TOE) definida em 5.2.2.1. O sistema de extração foi operado em contra corrente, com fator de extração 2,8 (produzido 2,8 kg de extrato para 1,0 kg de café torrado), com tempo entre ciclos de 30 minutos. O resíduo da extração (RE) foi utilizado nos itens 5.2.2.3 e 5.2.2.4. e o café solúvel produzido (EA) foi liofilizado para análises e comparação entre as etapas. Observa-se que o fator de extração térmica aumentou de 2,0 (Capítulos 3 e 4) para 2,8, pois em teste preliminar observou-se que o aumento da temperatura de extração gera um aumento de concentração em sólidos solúveis, o que permite aumentar o fator, aumentando o rendimento da etapa sem redução de concentração do EA quando comparado com os experimentos dos Capítulos 3 e 4.

5.2.2.3 - Hidrólise Térmica do RE

Utilizando-se RE do item 5.2.2.2, efetuou-se hidrólise térmica em um conjunto de 3 colunas extratoras em série, com água de alimentação à 180 °C. O sistema foi operado em contra corrente com fator de extração 6,5 (produzido 6,5 kg de extrato para 1,0 kg de café torrado), com tempo entre ciclos de 30 minutos. O produto desta etapa, café hidrólise térmica (CHT) foi liofilizado para análise e comparação com os produtos obtidos nas outras etapas. Também se coletou o resíduo da hidrólise térmica (RHT) para análises. Para esta

etapa utilizou-se fator de extração 6,5 porque em experimentos preliminares verificou-se que à partir deste fator a concentração de sólidos solúveis no extrato tendia a zero.

5.2.2.4 - Hidrólise Enzimática do RE

Utilizando-se RE do item 5.2.2.2, secando-o em estufa a 60 °C (umidade menor que 3,0%), para processamento em moinho de laboratório refrigerado a 5 °C (IKA® - modelo A10), e logo após peneirou-se para obter partículas menores que 500 µm. O substrato finamente moído foi ressuspendido na concentração 10% (m/v) em tampão citrato 50 mM. Os experimentos de hidrólise enzimática foram conduzidos a 50 °C e pH 5,0, em reator de vidro com controle de temperatura por meio de circulação de água proveniente de banho termostaticado na camisa (Figura 5-1). A agitação mecânica foi mantida em 350 RPM. Todos os ensaios de hidrólise enzimática com o RE obtido sob a nova temperatura ótima de extração foram realizados em triplicata de acordo com as concentrações de enzima indicadas na Tabela 5.1. As condições escolhidas para os novos experimentos de hidrólise constituem repetições de experimentos já realizados no ponto central, no ponto 2 (menor rendimento) e no ponto 8 (maior rendimento), conforme apresentado no Capítulo 4, Tabela 4.3. É importante destacar que, nesses novos experimentos, o preparado Ultraflo® XL foi excluído tendo em vista que a análise estatística mostrou que ele não contribuiu significativamente para a solubilização de carboidratos como açúcares livres presentes no substrato RE ($p < 0,10$).

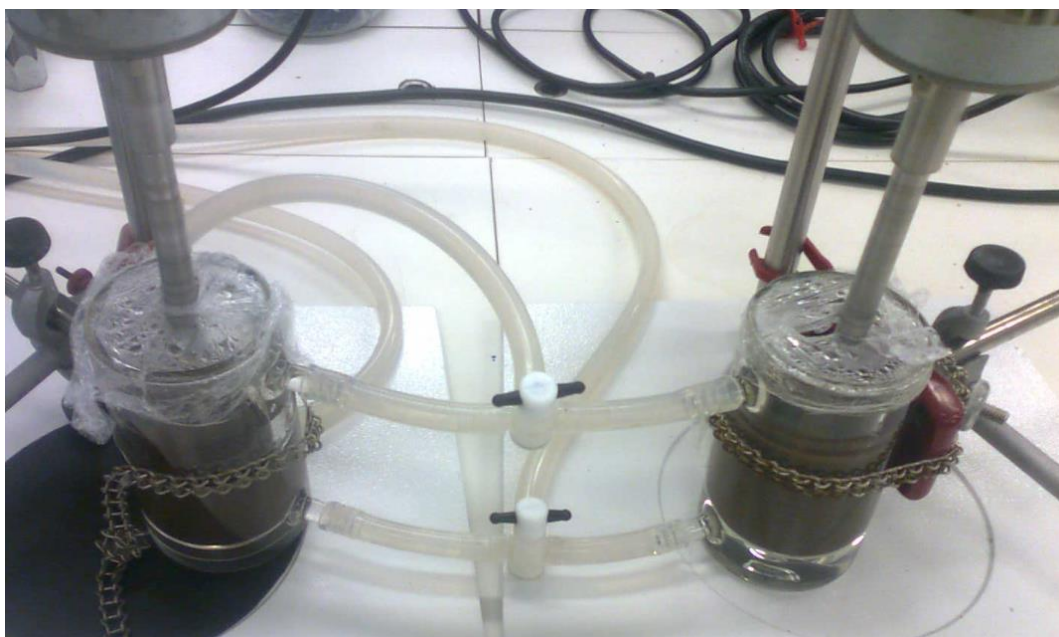


Figura 5-1: Reatores Enzimáticos Trabalhando em Paralelo

Tabela 5.1: Experimentos de Hidrólise Enzimática do RE

Preparados Enzimáticos	Pontos do delineamento capítulo 4 - Tabela 4.3		
	Ponto 9 (central)	Ponto 2	Ponto 8
Powercell (% m/m)	0,06	0,00	0,12
Galactomananase (% m/m)	0,06	0,10	0,10

O produto desta etapa, café hidrólise enzimática (CHE) foi liofilizado para análises e comparado com os produtos obtidos nas outras etapas. O resíduo da hidrólise enzimática (RHE) também foi coletado e analisado para o ponto 8.

Para termos uma visão global do processo, podemos consultar o fluxograma da figura 4-3, somente substituindo a temperatura de 125 °C pela temperatura definida em 5.2.2.1.

5.2.3 – Métodos analíticos

Os produtos obtidos em 5.2.2.1, 5.2.2.2 e 5.2.2.3 e 5.2.2.4 foram analisados de acordo com as metodologias descritas a seguir:

5.2.3.1 – Sólidos Solúveis:

Leitura de °Brix (Refratômetro Atago® RX-5000) que foi convertida em sólidos solúveis em % (m/m) utilizando tabela de conversão (SIVETZ; DESROSIER, 1979).

5.2.3.2 – Teores de lipídeos:

Foram determinados por gravimetria após extração das amostras com éter de petróleo, pela metodologia descrita pelo laboratório NREL (SLUITER et al., 2008).

5.2.3.3 – Carboidratos:

Os carboidratos totais nos materiais insolúveis (CT, RE, RHT e RHE) foram determinados após a extração dos lipídeos (5.2.3.2) por hidrólise em H₂SO₄ 1,0 M (300 mg de amostra para 50 mL de ácido) por 2 horas a 110 °C em autoclave, e quantificados utilizando-se HPAEC-PAD (NATTORP, 2000). Os carboidratos totais foram determinados nos materiais solúveis (EA, CHT e CHE) por hidrólise utilizando HCl 1,0M (300 mg de amostra para 50 mL de ácido) a 98 °C por 2,5 horas e quantificados por HPAEC-PAD de acordo com o método ISO para café solúvel (ISO 11292, 1995).

5.2.3.4 – Análise de Aminoácidos

As amostras desengorduradas (5.2.3.2) foram hidrolisadas pelo seguinte procedimento: Em recipiente para hidrólise, adicionou-se 300,0 mg da amostra e 3,00 ml de HCl 6,0 M, efetuou-se vácuo e injetou-se nitrogênio (atmosfera inerte). Após hidrólise por 17 horas à 110 °C, resfriou-se a amostra e evaporou-se o ácido em estufa à 60 °C. A amostra seca foi novamente diluída em HCl 0,1 M e completou-se o volume para 100 ml (balão volumétrico), sendo a solução filtrada com membrana de 0,22 µm e 0,50 mL transferido para o vial de cromatografia líquida (SIMPSON; NEUBERGER; LIU, 1976).

As análises das amostras por HPLC foram efetuadas nas seguintes condições: a) Colunas AminoPac PA10 Analytical (2 x 250 mm, P/N 055406) com coluna guarda AminoPac PA10 (2 x 50 mm, P/N 055407); b) Fluxo: 0,25 mL/min com volume de injeção: 10 mL (modo Completo ou Parcial), temperatura de 30 °C com os eluentes A: Água Milli-Q, B: NaOH 250 mM, C: acetato de sódio 1,0 M, cujos gradientes em função do tempo estão especificados na Tabela 5.2; C) detector amperométrico integrado com Célula de Ouro AAA-Certificada (P/N 055832) com eletrodo de referência Ag/AgCl, modo de referência pelo pH. (DIONEX Technical Note 50).

Tabela 5.2 – Gradiente de eluentes para análise de aminoácidos por HPLC-PAD

Tempo (minutos)	% A	% B	% C
0,0	76	24	0
2,0	76	24	0
8,0	64	36	0
11,0	64	36	0
18,0	40	20	40
21,0	44	16	40
23,0	14	16	70
42,0	14	16	70
42,1	20	80	0
44,1	20	80	0
44,2	76	24	0
75,0	76	24	0

5.2.3.5 – Análise de Voláteis

Os compostos acetaldeído, furfural e 5-hidróxi-metil-furfural (5-HMF) foram quantificados em solução aquosa contendo 3,0% (m/m) de material extraído por HS-SPME-GC-MS com coluna HP-INNOVAX (VIEGAS; BASSOLI, 2007).

5.2.3.6 – Determinação da Viscosidade de Soluções de Café

Utilizando-se viscosímetro rotacional (Brookfield[®], digital DVE), determinou-se a viscosidade em solução dos cafés produzidos por extração térmica, hidrólise enzimática e hidrólise térmica, em uma faixa de concentração de 10 a 30% (m/m), com temperatura controlada em 25 °C. Estes dados foram utilizados para cálculo da massa molecular média, conforme descrito a seguir.

5.2.3.7 – Avaliação Sensorial

Foi conduzida seguindo metodologia descrita no capítulo 4 (item 4.2.3.3)

5.2.4 – Procedimentos de Cálculo

5.2.4.1 – Rendimento e recuperação dos componentes

Os rendimentos foram calculados pela equação 4.1 e as recuperações em termos de balanço de massa global e por componentes (açúcares) foram calculadas utilizando-se das equações 4.2 e 4.3.

5.2.4.2 – Massa Molecular

Através das medidas de viscosidade das soluções dos EA, CHT e CHE em diferentes concentrações (5.2.3.6), determinou-se a viscosidade específica pela equação 5.3. Com os dados de viscosidade específica em função da concentração da solução, determinou-se a viscosidade intrínseca por regressão linear da equação 5.4 (coeficiente

linear da reta), e calculou-se a massa molecular pela equação 5.1, utilizando-se os parâmetros determinado por Beer, Wood e Weisz (1999).

5.3- RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1 – Determinação da temperatura ótima de extração

Os resultados da execução do item 5.2.2 (carboidratos totais e voláteis) encontram-se na Tabela 5.3. Como esperado, observa-se aumento nas concentrações de galactose, arabinose e manose presentes nos carboidratos solubilizados com o aumento da temperatura de 120 a 165 °C. Nesta mesma temperatura, a concentração de furfural alcançou 162 ppb, indicando que iniciou-se a degradação de arabinose. Entretanto escolheu-se a temperatura de 165 °C como a temperatura ótima de extração (TOE), porque somente nesta temperatura conseguiu-se atingir a concentração de galactose obtida por hidrólise térmica (Tabela 4.7).

Tabela 5.3: Composição em carboidratos totais em (% m/m) e furfural (ppb) obtidos nas diversas temperaturas de extração ou hidrólise térmica.

Temperaturas (°C)	Arabinose (% m/m)	Galactose (% m/m)	Manose (% m/m)	Glicose (% m/m)	Furfural (mg/kg)
120	1,22	1,02	0,23	0,77	52
130	2,43	3,60	1,58	1,57	20
150	4,96	7,23	4,95	1,38	25
160	8,48	14,77	8,08	0,88	27
165	8,74	23,80	11,15	0,62	162
170	6,73	25,94	8,24	0,48	97
175	4,92	24,83	11,35	0,45	98

Médias de análises em duplicata com variação menor que 2,5% entre cada amostra individualmente

A Tabela 5.3 evidencia a dificuldade de solubilização de manose, ou seja, a quebra da ligação β -1,4 entre as manoses na cadeia principal dos GMs. Esses resultados estão de acordo com Leloup & Liardon (1993).

5.3.2 – Comparações de rendimento, açúcares totais e voláteis entre as etapas extração térmica, hidrólise térmica e hidrólise enzimática.

Os resultados obtidos nos experimentos descritos em 5.2.2.2, 5.2.2.3 e 5.2.2.4 encontram-se na Tabela 5.3. Observem-se as seguintes diferenças no desempenho dos

processos quando aumentamos a temperatura da etapa de extração aromática de 125 °C (Capítulo 4) para 165 °C:

5.3.2.1 - *Rendimento*

Comparando-se os rendimentos da Tabela 4.4 com os da Tabela 5.4, observa-se que na extração térmica (EA) houve um aumento de 20,0% para 36,1%, enquanto na hidrólise enzimática (CHE ponto 8) o aumento foi de 22% para 27%, quando a temperatura da extração térmica foi elevada para 165 °C. Portanto, de fato o aumento da temperatura da extração térmica contribui principalmente para aumentar o rendimento na própria etapa, apresentando um efeito mais discreto no aumento do rendimento da hidrólise enzimática do substrato RE. Calculando-se o rendimento de extração global atingiu-se 54% (torrado em base seca), que é superior ao sugerido pelo processo GEA-NIRO para o café arábica, de 48% (GEA-NIRO, 2013).

Tabela 5.4: Rendimento, açúcares totais e voláteis dos extratos EA, CHT e CHE.

	EA	CHT	CHE (ponto central)	CHE (ponto 2)	CHE (ponto 8)	
Rendimento (%)	36,1 ± 0,3	29,0 ± 0,9	24,7 ± 0,2	22,6 ± 0,2	27,1 ± 0,6	
Lipídeos (%)	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	11,9 ± 0,8	12,1 ± 0,6	10,2 ± 0,8	
CARBOIDRATOS (% m/m)	Arabinose	6,94 ± 0,12	1,55 ± 0,12	3,22 ± 0,11	3,06 ± 0,19	4,15 ± 0,26
	Galactose	20,97 ± 0,44	20,76 ± 1,36	11,09 ± 0,34	11,70 ± 0,41	13,72 ± 0,09
	Glicose	1,07 ± 0,06	1,19 ± 0,11	4,35 ± 0,10	2,69 ± 0,16	5,73 ± 0,23
	Manose	11,65 ± 0,32	38,20 ± 0,85	14,10 ± 0,04	13,84 ± 0,20	19,74 ± 0,37
	Manitol	0,11 ± 0,00	0,57 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,25 ± 0,01
	Fucose	0,22 ± 0,01	0,15 ± 0,05	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,02
	Xilose	0,13 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,01
	Frutose	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,03
	Ribose	0,15 ± 0,12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Total	41,25 ± 1,12	62,69 ± 2,91	33,32 ± 0,25	31,87 ± 0,06	43,97 ± 0,78
Acetaldeído (ppb)	4.691 ± 140	10.628 ± 265	---	---	2.865 ± 95	
Furfural (ppb)	25.320 ± 886	21.223 ± 591	---	---	3.068 ± 116	
5-HMF (ppb)	N.D.	1.426 ± 53	---	---	N.D.	

ND – não detectado, médias ± IC (95%) e n=3

Entretanto, observa-se que parte do rendimento da hidrólise enzimática foi conseguida mediante solubilização de lipídeos, ou seja, os grãos de café finamente moídos liberam parte da fração lipídica durante a extração enzimática. O mesmo fenômeno provavelmente ocorreu no processo proposto por Silver et al. (2007), onde os autores utilizaram um moinho coloidal para produzir partículas com diâmetro médio 75 µm para a

extração enzimática, possivelmente aumentando ainda mais o efeito de solubilização da fração lipídica.

5.3.2.2 – Composição de Carboidratos:

Galactose:

Comparando as composições de açúcares totais da tabela 4.7 com a tabela 5.3, observa-se que na temperatura de 165 °C a concentração de galactose no EA aumentou de 2,6% para 20,97%, enquanto no CHE, o aumento foi de 8,8% para 13,72% para o ponto 8. Pode-se, assim, concluir que atingiu-se o objetivo de aumentar a concentração de galactose nas frações solubilizadas tanto por extração térmica como por hidrólise enzimática. Surpreendentemente, constatou-se ainda que a concentração de galactose manteve-se constante para o CHT (na ordem de 20%).

Arabinose:

Também observa-se que a concentração de arabinose no EA aumentou de 3,1% para 6,9% quando se trabalhou na TOE, indicando que temos menor quantidade de arabinose disponível para degradação na etapa de hidrólise térmica.

Quando comparamos os CHT se observa redução na concentração de arabinose de 4,6% para 1,55%, resultado esperado tendo em vista o aumento da arabinose no EA. Porém, no CHE (ponto 8), a concentração de arabinose atinge 4,15%, indicando que o processo enzimático foi mais eficiente que o processo térmico. Esse resultado pode ser explicado pela fácil degradação deste carboidrato a 180 °C, contribuindo para a geração de furfural.

Glicose:

Com relação à glicose, observamos na Tabela 5.4 que novamente o processo enzimático produziu uma composição de 5,73% (CHE Ponto 8), superior a 1,19% (CHT), indicando a eficiente ação das celulasas presentes nos preparados enzimáticos comerciais.

Manose:

A adoção da TOE para a extração térmica permitiu aumento da concentração de manose no EA de 0,9% para 11,65%. E o RE processado nesta temperatura também permitiu maior solubilização de manose, aumentando a sua concentração de 12,0% para 19,74% em CHE (Ponto 8). Porém na Tabela 5.4 observa-se ainda concentração de

38,20% de manose em CHT, indicando que o processo de hidrólise enzimática pode ser melhorado.

5.3.2.3 – Composição de Voláteis indesejados

Com relação ao furfural observa-se que o aumento de temperatura de extração de 125 °C para 165 °C gerou um aumento de furfural de 24.133 ppb (tabela 4.10) para 25.320 ppb (tabela 5.3) no EA, ou seja, um incremento de 4,7%, porém com o benefício de aumentar a concentração de galactose em aproximadamente 10 vezes.

Finalmente, nota-se que o CHT (tabela 5.3) apresentou 21.223 ppb de furfural, enquanto na tabela 4.4 essa concentração foi de 48.900 ppb. A redução na formação de furfural está ligada à maior extração de arabinose na temperatura de 165 °C. Como consequência, o RE tem menor quantidade de arabinose para ser degradada a furfural na hidrólise térmica a 180 °C do que no experimento do capítulo 4.

5.3.3 – Recuperação Global e de Carboidratos

Na Tabela 5.5 encontram-se os resultados da recuperação por meio do balanço de massa global (equação 4.2). Verifica-se que, em todos os casos, a massa de produto obtida foi consistente com a massa de matéria-prima empregada.

Para avaliar a recuperação dos principais carboidratos presente nos produtos, as composições em açúcares totais dos materiais sólidos CT, RE, RHT e RHE foram analisadas (5.2.3.3) e encontram-se na Tabela 5.6, juntamente com os teores de lipídeos (5.2.3.2).

Tabela 5.5: Recuperação calculada à partir do balanço global de sólidos

PROCESSO	INÍCIO (g)		FINAL (g)		RECUPERAÇÃO (%)
Extração Térmica	CT	2290,6	EA	827,4	99,8
			REA	1458,6	
Hidrólise Térmica	RE	1458,6	CHT	268,8	101,5
			RHT	1212,0	
Hidrólise Enzimática (ponto 8)	RE	20,0	CHE	5,5	98,5
			RHE	14,2	

Tabela 5.6: Composição de lipídeos e açúcares em CT, RE, RHT e RHE

(% m/m)	CT	RE	RHT	RHE (ponto 8)
Lipídeos	15,4	16,9	32,0	14,7
Arabinose	4,07	2,53	1,04	2,23
Galactose	14,27	12,27	3,60	11,85
Glicose	6,75	9,37	11,92	9,83
Manose	21,47	25,61	21,43	27,65
Manitol	0,48	0,54	0,48	0,64
Fucose	0,08	0,17	0,02	0,15
Xilose	0,20	0,08	0,07	0,06
Frutose	0,04	0,02	0,01	0,01
Ribose	0,01	0,00	0,00	0,01
Açúcares totais	47,38	50,59	39,02	52,50

Médias de análises em duplicata com variação menor que 2,5% entre cada amostra individualmente

Com relação aos lipídeos, verifica-se que o valor obtido para o CT é similar aos 16,0 % encontrado em literatura (OOSTERVELD et al., 2003). Também observa-se que a composição de lipídeos aumenta na fração insolúvel à medida que ocorre a solubilização dos carboidratos (15,4% em CT, 16,9% em RE e 32,0% em RHT) exceto para o RHE (14,7% de lipídeos), porque na hidrólise enzimática utiliza-se um RE finamente moído, permitindo a solubilização de lipídeos em solução aquosa.

Com relação aos açúcares totais, verifica-se que o CT possui açúcares totais (47,38%) em concentração similar à relatada em literatura (48,1%) (OOSTERVELD et al., 2003).

Observa-se também que a quantidade de glicose aumenta nos resíduos RE e RHT, já que a celulose é pouco solubilizada pelos processos térmicos. Já a concentração de glicose no RHE é menor que no RHT porque os preparados com atividades de celulasas solubilizam parte da celulose.

Os cálculos de recuperação para cada carboidrato foram efetuados utilizando-se as composições dos materiais solúveis EA, CHT e CHE (Tabela 5.4), e as composições dos materiais insolúveis CT, RE, RHT e RHE (Tabela 5.6), juntamente com as massas iniciais e finais em cada processo (Tabela 5.5) e a equação indicada em 4.2.4 (Equação 4.4). Os resultados estão na Tabela 5.7.

Na Tabela 5.7 verifica-se que todos os dados de recuperação estão consistentes, exceto na hidrólise térmica para os compostos arabinose (45,4%) e galactose (58,7%), que provavelmente são degradados pela elevada temperatura deste processo (180 °C).

Tabela 5.7: Recuperação de carboidratos para os açúcares arabinose, galactose, glicose, manose e açúcares totais.

PROCESSO	COMPONENTES	INICIO (g)	FINAL (g)	RECUPERAÇÃO (%)
Extração Térmica (165 °C)	Arabinose	93,28	94,25	101,0
	Galactose	326,75	352,49	107,9
	Glicose	154,64	145,5	94,1
	Manose	491,8	470,0	95,6
	Açúcares totais	1085,3	1079,2	99,4
Hidrólise Térmica	Arabinose	36,8	16,7	45,4
	Galactose	179,0	105,0	58,7
	Glicose	136,7	147,7	108,0
	Manose	373,6	362,4	97,0
	Açúcares totais	737,9	641,5	86,9
Hidrólise Enzimática*	Arabinose	0,51	0,55	108,0
	Galactose	2,45	2,44	99,3
	Glicose	1,87	1,72	91,8
	Manose	5,12	5,01	97,9
	Açúcares totais	10,12	9,87	97,5

*Experimento Ponto 8 (tabela 5.1)

5.3.4 – Massas Moleculares

As massas moleculares médias dos compostos foram determinadas como descrito em 5.2.4.2 a partir dos dados viscosimétricos das soluções dos materiais EA, CHT e CHE, conforme apresentados a seguir.

Nas tabelas 5.8, 5.9 e 5.10, estão relacionados os dados de viscosidades em diferentes concentrações, que foram inicialmente medidas em °Brix e transformadas em % (m/m) e densidades, utilizando tabela de conversão proposta por Sivetz & Desrosier (1979).

Tabela 5.8: Dados viscosimétricos do EA em função da concentração de sólidos solúveis (C)

Concentração (% m/m)	Densidade (g/mL)	Concentração (g/dL)	$\mu_{\text{solução}}$ (cP)	$\mu_{\text{específica}}$	$\frac{\mu_{\text{específica}}}{C}$ (dL/g)
14,88	1,0643	1,3981	2,44	1,74	1,25
17,22	1,0746	1,6025	2,83	2,18	1,36
18,56	1,0806	1,7176	3,11	2,49	1,45
21,18	1,0918	1,9399	3,79	3,26	1,68
23,20	1,1010	2,1072	4,50	4,06	1,92

 $\mu_{\text{solvente}} = 0,89$ cP (água a 25 °C), EA: Extrato Aromático

Tabela 5.9: Dados viscosimétricos do CHT em função da concentração de sólidos solúveis (C)

Concentração (% m/m)	Densidade (g/mL)	Concentração (g/dL)	$\mu_{\text{solução}}$ (cP)	$\mu_{\text{específica}}$	$\frac{\mu_{\text{específica}}}{C}$ (dL/g)
13,99	1,0604	1,3193	3,09	2,47	1,87
15,60	1,0607	1,4707	3,63	3,08	2,09
17,66	1,0766	1,6403	4,29	3,82	2,33
20,00	1,0870	1,8399	5,14	4,78	2,60
23,02	1,1008	2,0912	6,55	6,36	3,04

$\mu_{\text{solvente}} = 0,89$ cP (água a 25 °C), CHT: Café Hidrólise Térmica

Tabela 5.10: Dados viscosimétricos do CHE (ponto 8) em função da concentração de sólidos solúveis (C)

Concentração (% m/m)	Densidade (g/mL)	Concentração (g/dL)	$\mu_{\text{solução}}$ (cP)	$\mu_{\text{específica}}$	$\frac{\mu_{\text{específica}}}{C}$ (dL/g)
15,44	1,0607	1,4556	2,24	1,52	1,04
17,22	1,0766	1,5995	2,51	1,82	1,14
19,19	1,0870	1,7654	2,88	2,24	1,27
21,66	1,1002	1,9687	3,28	2,69	1,36

$\mu_{\text{solvente}} = 0,89$ cP (água a 25 °C), CHE: Café Hidrólise Enzimática

A partir os dados das Tabelas 5.8, 5.9 e 5.10, construiu-se os gráficos de $\frac{\mu_{\text{específica}}}{C}$ em função de $\mu_{\text{específica}}$, e determinou-se as viscosidades intrínsecas como os coeficientes lineares das retas ajustadas, como mostrado nas figuras 5-2, 5-3 e 5-4.

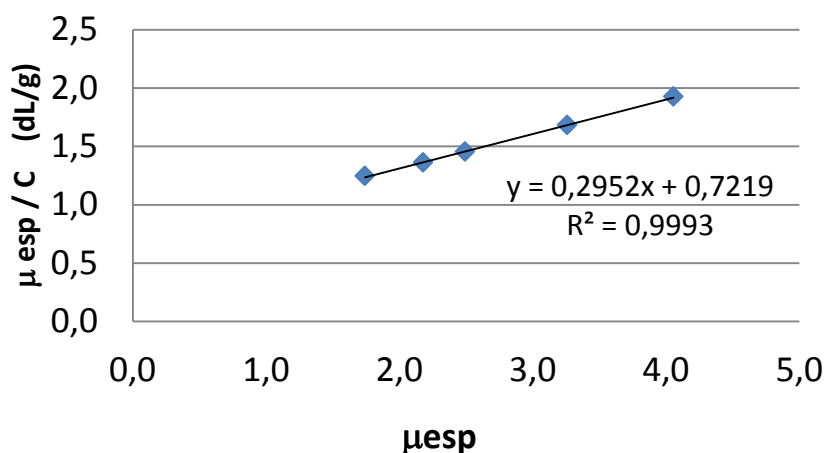


Figura 5-2: Regressão linear dos dados da Tabela 5.8 (EA)

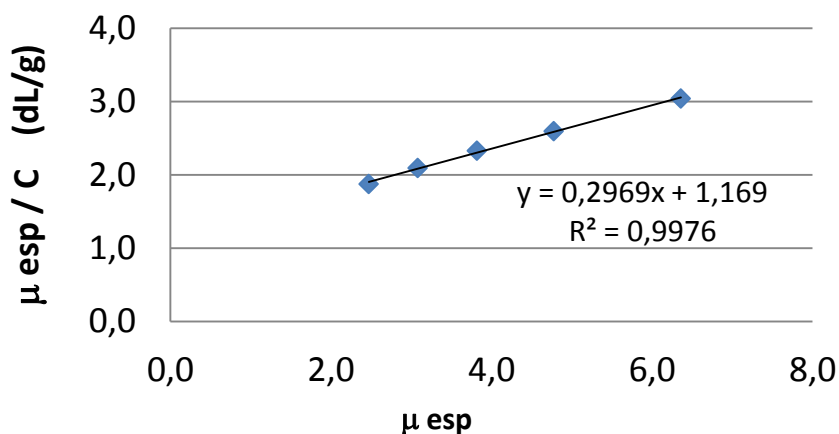


Figura 5-3: Regressão linear dos dados da Tabela 5.9 (CHT)

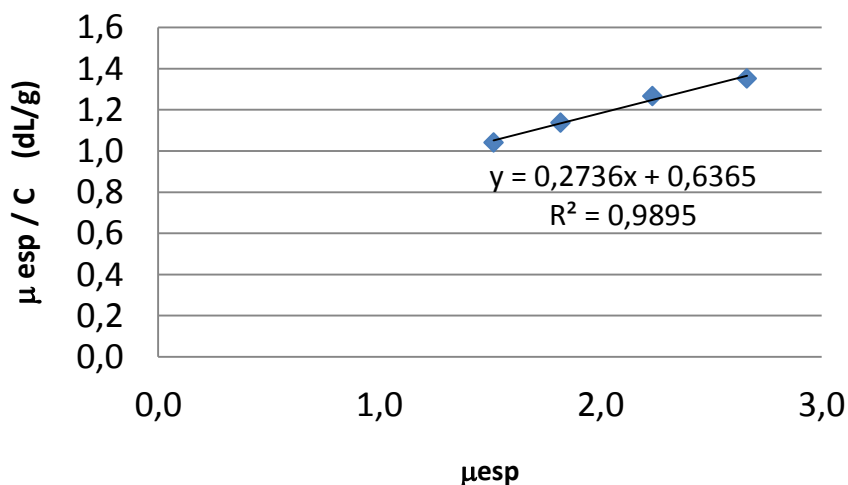


Figura 5-4: Regressão linear dos dados da Tabela 5.10 (CHE – Ponto 8)

A partir dos coeficientes lineares dos gráficos das figuras 5-2, 5-3 e 5-4, determinou-se as viscosidades intrínsecas $[\mu]$, e, empregando a equação 5.1, foram calculadas as massas moleculares de EA, CHT e CHE (Ponto 8) que estão apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11: Massas moleculares calculadas pela equação 5.1

ETAPAS	$[\mu]$ (dL/g)	MM (Da)
EA	0,7219	23.590
CHT	1,1690	46.075
CHE (ponto 8)	0,6365	19.805

Observa-se que a massa molecular do material solubilizado por hidrólise térmica tem um valor 2 vezes maior que o extrato aromático, indicando que a partir de 165 °C são solubilizados compostos de maior massa molecular. Já o produto CHE possui massa

molecular menor que o EA, o que pode ser atribuído ao fato das enzimas presentes nos preparados continuarem a hidrolisar os polissacarídeos que já foram solubilizados.

Leloup e Liardon (1993) determinaram a massa molecular de AGs e GMs isolados do café arábica torrado, utilizando Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), e encontram uma faixa de 200 a 50.000 Da para os AGs e 200 a 80.000 Da para os GMs. Os resultados calculados para os produtos da Tabela 5.11 estão na mesma ordem de grandeza.

5.3.5 – Composições de Aminoácidos

Os aminoácidos, que constituem os materiais utilizados e produzidos foram analisados de acordo com 5.2.3.4 e estão apresentados na Tabela 5.12.

Constata-se que o total dos aminoácidos (proteínas) no café torrado é de 6,83%, o que está de acordo com o valor de 6,8 %, determinado por Oosterveld et al. (2003) para o café arábica. Observa-se também que o RHE contém mais aminoácidos totais (5,78%) que o RHT (3,52%), o que possivelmente está associado à degradação destes compostos à 180 °C (condições da hidrólise térmica).

Tabela 5.12: Quantificação de aminoácidos em CT, RE, RHT, RHE, EA, CHT e CHE.

Amino ácidos (% m/m)	CT	RE	RHT	RHE	EA	CHT	CHE*
Arginina	2,20	1,75	1,23	1,27	3,17	2,11	2,81
Lisina	0,06	0,05	0,03	0,07	0,05	0,07	0,04
Glutamina	0,23	0,25	0,01	0,15	0,23	0,41	0,19
Asparagina	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Alanina	0,15	0,20	0,18	0,24	0,14	0,26	0,15
Treonina	0,16	0,18	0,07	0,20	0,09	0,21	0,10
Glicina	0,58	0,24	0,17	0,29	0,20	0,36	0,18
Trans-4- Hidroxi L-Prolina	0,03	0,05	0,02	0,04	0,03	0,10	0,03
Serina	0,05	0,19	0,03	0,18	0,12	0,18	0,11
Prolina	0,00	0,12	0,33	0,09	0,17	0,22	0,23
Isoleucina	0,85	0,20	0,13	0,25	0,21	0,26	0,17
Leucina	0,01	0,30	0,17	0,30	0,35	0,35	0,26
Metionina	0,01	0,02	0,01	0,01	0,09	0,18	0,00
Histidina	0,07	0,15	0,11	0,02	0,09	0,01	0,01
Fenilalanina	0,20	0,26	0,20	0,25	0,21	0,23	0,19
Glutamato	0,19	0,15	0,56	1,56	0,72	0,38	0,27
Aspartato	0,52	0,39	0,08	0,58	0,56	0,05	0,30
Cistina	0,01	0,02	0,00	0,03	0,00	0,01	0,01
Cisteina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tirosina	0,24	0,26	0,18	0,26	0,27	0,30	0,22
Triptofano	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	6,83	4,78	3,52	5,78	6,72	5,70	5,26

*CHE no Ponto 8, e todos os resultados são médias de análises em triplicata

Casal et al. (2005) estudaram as transformações das proteínas ao longo do processo de torra e, para o café arábica com grau de torra similar ao utilizado, encontrou-se 6,5% de aminoácidos totais, embora os constituintes variem bastante em composição.

Comparando o perfil peptídico dos CHT e CHE (Tabela 5.12), somente as concentrações de Arginina e Aspartato são superiores no CHE, o que não justifica grande diferença de sabor nestes produtos pela hidrólise de proteínas (liberação de amino ácidos de sabor amargo), que foi uma hipótese levantada no Capítulo 4.

5.3.6 – Avaliação Sensorial

A avaliação sensorial dos cafés EA, CHT e CHE liofilizados (Figura 5-5), foi efetuada por provador treinado de acordo com a metodologia descrita em 5.2.3.7, que atribuiu as notas apresentadas na Tabela 5.13.

Tabela 5.13: Resultado das avaliações sensoriais para os produtos EA, CHT e CHE.

Café Liofilizado	DOCE	ÁCIDO	AMARGO	SALGADO
EA	1	0	2	0
CHT	0	3	3	1
CHE*	1	2	1	0

*Experimento (Ponto 8)

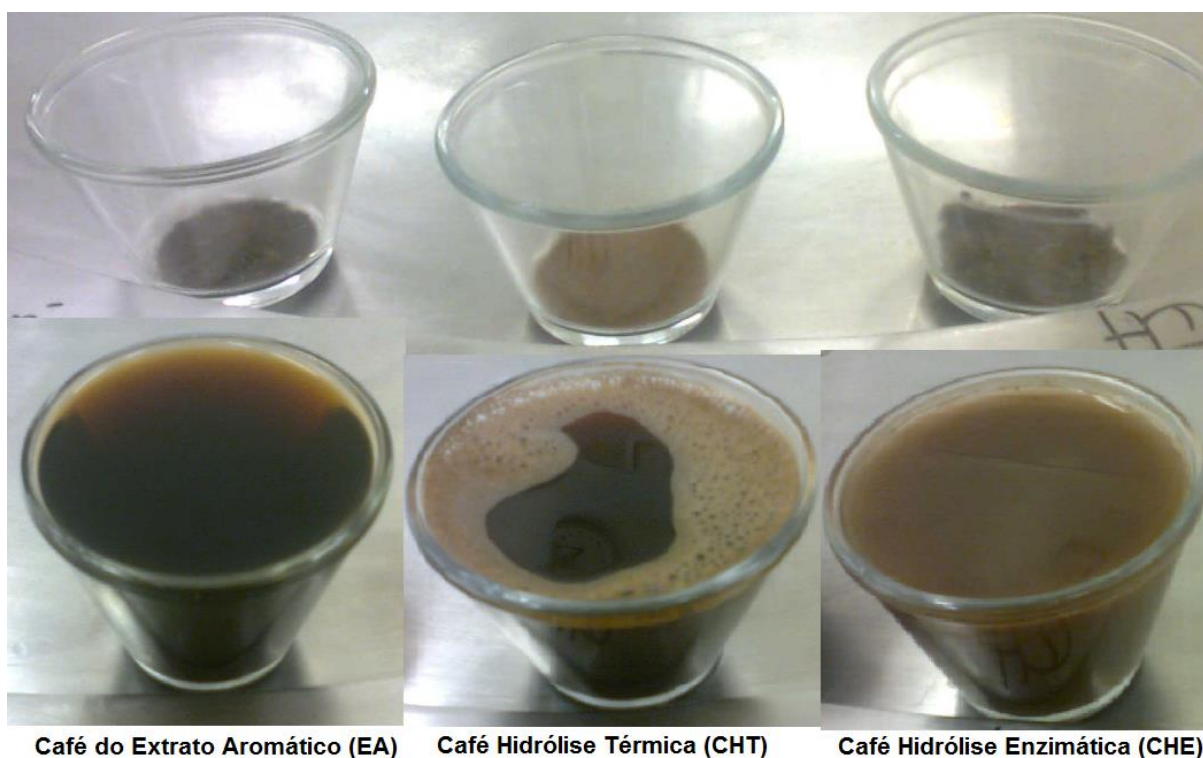


Figura 5-5: Cafés do EA, CHT e CHE antes e após a adição de água (amostras para avaliação sensorial)

O café EA foi descrito com características de café fresco, frutal, adocicado e com características de café de coador (torrado e moído), enquanto o CHT foi avaliado como ácido e amargo, com aroma que lembra milho torrado. Já o CHE apresenta características que lembram borra de café solubilizada, podendo ser utilizado para efetuar um *blend* no EA aumentando o rendimento do processo sem incorporar voláteis indesejados.

Com relação ao sabor amargo relatado no CHE (Capítulo 4), esta característica poderia estar associada a fragmentos de proteínas liberados pela ação das enzimas. Por essa razão, foram analisados os aminoácidos presentes nestes materiais pela metodologia descrita em 5.2.3.4, e constatou-se quantidades semelhantes de aminoácidos para EA, CHT e CHE que correspondem respectivamente a 4,50, 4,78 e 4,19% de aminoácidos totais. Porém, no experimento com a temperatura de extração térmica a 165 °C extraiu-se uma quantidade de aminoácidos totais 1% superior em EA (6,72%) do que em CHT (5,70%) e CHE (5,26%), que pode ter gerado um sabor mais amargo em EA (atribuído nota 2 na avaliação sensorial, Tabela 5.13), porém considerado amargo natural do café pelo avaliador.

5.3.7 – Estimativas de Custo do Processo Enzimático

Efetou-se uma estimativa de aumento de custos do processo enzimático (Capítulo 5) em relação ao processo térmico, considerando-se que os custos de processos serão similares (no processo enzimático utiliza-se menos vapor em aquecimento, porém deve-se acrescentar uma etapa de moagem adicional que consome energia), então considerou-se os custos adicionais no processo como o custo das enzimas utilizadas. As estimativas foram feitas em dólares americano (USD) porque tanto o café solúvel como as enzimas são cotadas no mercado internacional nesta moeda, sendo o café solúvel em média USD 4,50 por kg e as enzimas (Powercell e Galactomananase-HBI) USD 200,00 por kg.

Calculo-se do Resultado Líquido (Tabela 5.14) que é a diferença entre o valor dos sólidos solúveis solubilizados (USD) e o custo adicional devido ao uso da enzima (USD), observando-se que no Ponto 8 embora o rendimento é maior, o retorno econômico é menor devido ao uso de maior quantidade de enzima.

Tabela 5.14 – Custos dos adicionais do processo enzimático: Base de cálculo 100 kg de RE

Ensaio	Rendimento (%)	Sólidos Solúveis		Enzimas		Custo adicional (USD/kg)	Resultado Líquido (USD)
		(kg)	Receita (USD)	(g)	Custo (USD)		
Ponto 2	22,6	22,6	101,70	100	20,00	0,885	81,70
Ponto central	24,7	24,7	111,15	120	24,00	0,972	87,15
Ponto 8	27,1	27,1	121,95	220	44,00	1,624	77,95

RE: Resíduo da Extração, USD: dólares americanos

5.4 – CONCLUSÕES

A determinação de temperatura ótima de extração (TOE) de 165 °C, para produção do EA, aprimorou o processo de extração, mantendo praticamente constante a concentração de voláteis indesejados (acetaldeído, furfural e 5-HMF) e possibilitando aumentar a concentração de galactose com açúcar total de 2,3 % (processo à 125 °C) para 20,76% , contornando a deficiência em atividades de galactanases nos preparados enzimáticos estudados.

O processo de hidrólise térmica reduz a recuperação de arabinose (45,4%) e galactose (58,7%) que está associado à degradação térmica destes compostos quando submetidos à temperatura de 180 °C.

A extração térmica a 165 °C possibilita equiparar o rendimento global do processo combinado extração térmica e hidrólise enzimática (53,4%) com o do processo convencional (extração térmica seguida de hidrólise térmica) que foi de 54,6%, embora as concentrações de carboidratos no CHE ainda permanecem menores do que no CHT, indicando que ainda existe espaço para melhoria do processo de hidrólise enzimática. Outro fator a se destacar foi o aumento de rendimento global com relação ao processo GEA-NIRO tradicional que foi de 48%.

Na avaliação sensorial o EA obtido a 165 °C apresentou somente um aumento no sabor amargo, sendo as demais semelhantes ao EA extraído a 125 °C, mantendo as características de café de coador. Por outro lado o CHE teve sua característica amarga drasticamente reduzida, levando a concluir que compostos que não são extraídos à 125 °C (Capítulo 4) são solubilizados na hidrólise enzimática gerando o amargor. Porém, quando o CT é extraído à 165 °C, esses compostos não estão mais presentes no RE, o que contribui para reduzir o sabor amargo.

Porém, apesar da redução do amargo graças à alteração da temperatura na etapa de extração térmica e do aumento no teor em galactose e outros açúcares, o produto CHE não apresenta características compatíveis com um café solúvel de qualidade, como o EA, porém pode ser utilizado como blend em EA, aumentando o rendimento do processo sem introduzir quantidade significativa de voláteis indesejados. O sabor identificado como borra de café solubilizada pelo provador é justamente resultado do modo de ação das enzimas, que atuam tanto nos biopolímeros presentes no café como nos produtos liberados durante a hidrólise, conforme discutido no item 3.3, gerando um hidrolisado com massa molecular média (Tabela 5.11) significativamente menor do que o correspondente obtido por

tratamento térmico. Neste caso, o uso de temperaturas superiores a 125 °C favorece a solubilização de polissacarídeos de cadeia maior, o que não ocorre a 50 °C.

Desta forma, o desenvolvimento de um processo enzimático para obtenção de café solúvel com sabor equivalente ao obtido pelo processo térmico depende da superação de vários desafios. Inicialmente, faz-se necessário identificar organismos produtores de enzimas com atividade predominantemente endo (mananase e galactanase) e alta afinidade pelas ligações presentes nos biopolímeros que constituem o café. Por meio de técnicas de Biologia Molecular, as enzimas selecionadas poderiam ser produzidas em organismos recombinantes para a produção de preparados enzimáticos especificamente formulados para a hidrólise enzimática do resíduo da etapa de extração. As condições de hidrólise (tempo, *mix* de enzimas e concentração de enzimas) devem ser avaliadas de forma a favorecer o acúmulo dos polissacarídeos com massa molecular acima de 40 kDa. Além disso, uma etapa final de aumento de temperatura deve ser incluída para solubilizar os polissacarídeos obtidos, obtendo-se assim o produto desejado.

5.5 - REFERÊNCIAS

- CASAL, S. et al. Roast effects on coffee amino acid enantiomers. **Food Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 333–340, fev. 2005.
- DE MARIA, C. A. B. et al. Arabinogalactan as a potencial furfural precursor in roasted coffee. **International Journal of Food Science And Technology**, v. 29, p. 559–562, 1994.
- DELGADO, P. A. et al. Sediments in coffee extracts: Composition and control by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 168–176, set. 2008.
- FIGUEIREDO, S. A.; LASHERMES, P.; ARAGÃO, F. J. L. Molecular characterization and functional analysis of the β -galactosidase gene during *Coffea arabica* (L.) fruit development. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 8, p. 2691–703, maio. 2011.
- ISO 11292. *Instant coffee determination of free and total carbohydrate content - method using high performance anionic exchange chromatography*.
- LELOUP, V.; LIARDON, R. **Analytical Characterization of Coffee Carbohydrates** ASIC. **Anais...**Montpellier: ASIC, 1993.
- NATTORP, A. **Kinetics of the Hydrolysis of Mannan in Plant Materials and in Solution. Experimental Study and Mathematical Modeling**. [S.l.] EPFL - Lausanne: Switzerland, 2000.
- OOSTERVELD, A. et al. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 285–296, 2003.
- SILVER, R. S. et al. **Enzyme-assisted soluble coffee production** .,Patent EP 1 745 702 A1, 2007.

SIMPSON, R. J.; NEUBERGER, M. R.; LIU, T. Y. Complete Amino Acid Analysis of Proteins from a Single Hydralsate. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 1936–1940, 1976.

SIVETZ, M.; DESROSIER, N. W. **Coffee Technology**. [S.l.] AVI Pub. Co., 1979.

SLUITER, A. et al. **Determination of Extractives in Biomass**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42619.pdf>>.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do Índice de Retenção Linear para a Caracterização de Compostos Voláteis em Café Solúvel Utilizando GC-MS e Coluna HP-INNOVAX. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2031–2034, 2007.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

As aplicações da catálise enzimática se fazem presentes ou em desenvolvimento em muitos setores da indústria de alimentos e química, com o objetivo de reduzir o consumo energético (reações conduzidas à baixa temperatura), minimização da geração de subprodutos tóxicos (maior especificidade das enzimas e menor degradação de reagentes e produtos em temperaturas mais baixas). Para a produção de café solúvel, embora esta solução ainda tenha espaço para ser aprimorada, foi constatada a sua viabilidade, conseguindo-se rendimento na hidrólise enzimática similar ao da hidrólise térmica (Tabela 5.3).

Observa-se que a composição de carboidratos em RHE ainda é de 52,5%, e como temos atividade para extrair manose que corresponde por 27,65% do RHE (tabela 5.5), possivelmente a hidrólise enzimática não ocorreu mais eficientemente, devido à dificuldade de acesso das enzimas na interior da partícula sólida. Por outro lado, se reduzirmos o tamanho das partículas através de uma tecnologia mais eficiente de moagem, possivelmente mais lipídeos serão solubilizados (tabela 5.3). O aumento da concentração de lipídeos no café solúvel deve ser evitado, pois alguns estudos relacionam os lipídeos do café com o aumento do nível de colesterol sérico (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Uma solução seria a remoção da fração lipídica do RE antes da hidrólise enzimática, e utilizar este subproduto para outros fins como, por exemplo, produção de biodiesel (ABDULLAH; KOC, 2013).

Outra limitação identificada no processo enzimático foi a reduzida solubilização da galactose, que se contornou com o aumento da temperatura de extração térmica de 125 °C para 165 °C. Entretanto, no RHE encontrou-se aproximadamente 11,85% da galactose não solubilizada (Tabela 5.3) que poderia contribuir para aumentar o rendimento do processo. A solubilização da galactose do café poderá ser conseguida mediante o desenvolvimento de preparados enzimáticos comerciais específicos para este substrato.

A produção de enzimas específicas para o substrato café por fermentação em estado sólido, utilizando-se o substrato RE para este propósito poderia ser realizada com abordagem similar aos processos em desenvolvimento para produção de celulases a partir do substrato bagaço de cana (RODRÍGUEZ-ZÚÑIDA et al., 2011).

Outra abordagem para aprimorar o processo de extração de café solúvel seria a aplicação de complexo enzimático antes do processo de extração térmica. Normalmente o café torrado fica estocado por volta de 18 horas, com o objetivo que desprender CO₂ e minimizar formação de espuma durante a extração. Durante este tempo os grãos poderiam ser tratados com preparados enzimáticos que facilitem a extração à 165 °C, principalmente de arabinose (atividade de α -arabinosidase), que demonstrou ser o carboidrato mais sensível à degradação térmica.

Deve-se ainda lembrar da questão do sabor amargo encontrado em CHE na Tabela 4-11, uma vez que a hidrólise enzimática de proteínas pode gerar o sabor amargo, normalmente associado às cadeias de oligopeptídeos hidrofóbicos presentes no meio (MAEHASHI; HUANG, 2009). O sabor amargo em café também pode ser decorrente da hidrólise de compostos fenólicos, que foi investigado por LC-MS/MS (cromatografia líquida com detectores de massa) (FRANK; BLUMBERG; KUNERT, 2007).

Com relação à atividade residual das enzimas que ficam presentes no CHE, estas podem ser facilmente inativadas por pasteurização, ou mesmo nos processos subsequentes, já que um extrato de café seco por *Spray Drying* é aquecido antes da atomização.

Finalmente, podemos dizer que o presente trabalho mostrou que o processo de hidrólise enzimática pode alcançar desempenho semelhante ao processo de hidrólise térmica (em rendimento), sendo a extração térmica a 165 °C o fator primordial para um equilíbrio entre extração e reações químicas de degradação. Porém, estudos complementares são necessários para que o produto obtido pelo processo alternativo apresente as características sensoriais compatíveis com um café solúvel de qualidade.

7 - REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ABDULLAH, M.; KOC, A. B. Oil removal from waste coffee grounds using two-phase solvent extraction enhanced with ultrasonication. **Renewable Energy**, v. 50, p. 965–970, 2013.

AKIRA, O. et al. **METHOD FOR PRODUCING CONCENTRATED COFFEE FROM HEATED AND HYDROLYZED EXTRACT.**, Patent JP2003009769 (A), 2003.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. BENEFÍCIOS DO CAFÉ NA SAÚDE: MITO OU REALIDADE? **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2169–2180, 2009.

BAGDONAITE, K.; DERLER, K.; MURKOVIC, M. Determination of Acrylamide during Roasting of. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 6081–6086, 2008.

BALTES, W. CHEMICAL CHANGES IN FOOD BY THE MAILLARD REACTION. **Food Chemistry**, v. 9, p. 59–73, 1982.

BEER, M. U.; WOOD, P. J.; WEISZ, J. A simple and rapid method for evaluation of Mark–Houwink–Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomanna. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, n. 4, p. 377–380, ago. 1999.

BELLIS, M. **The History How We Make Coffee**. Disponível em: <<http://inventors.about.com/od/cstartinventions/a/coffee.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2013.

BEL-RHLID, R. et al. **Coffee Extract**, Patent WO 2009/132888 A1, , 2009.

CASAL, S. et al. Roast effects on coffee amino acid enantiomers. **Food Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 333–340, fev. 2005.

DE MARIA, C. A. B. et al. Arabinogalactan as a potencial furfural precursor in roasted coffee. **International Journal of Food Science And Technology**, v. 29, p. 559–562, 1994.

DELGADO, P. A. et al. Sediments in coffee extracts: Composition and control by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 168–176, set. 2008.

DRIA, G. J. et al. **Method for reduction of acrylamide in roasted coffee bean**. Patent US 2004/0081724 A1, , 2004.

FERNANDES, S. M. et al. CONSTITUINTES QUÍMICOS E TEOR DE EXTRATO AQUOSO DE CAFÉS ARÁBICA (*Coffea arabica* L .) E CONILON (*Coffea canephora* Pierre) TORRADOS CHEMICAL EVALUATION AND AQUEOUS EXTRACT OF ROASTING COFFES (*Coffea arabic* L .) AND CONILON (*Coffea canephora* Pierre). **Clenc. agrotec.**, v. 27, p. 1076–1081, 2003.

FIGUEIREDO, S. A.; LASHERMES, P.; ARAGÃO, F. J. L. Molecular characterization and functional analysis of the β -galactosidase gene during *Coffea arabica* (L.) fruit development. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 8, p. 2691–703, maio. 2011.

FRANK, OL.; BLUMBERG, S.; KUNERT, C. Structure Determination and Sensory Analysis of Bitter-Tasting 4-Vinylcatechol Oligomers and Their Identification in Roasted Coffee by Means of LC-MS / MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 1945–1954, 2007.

GEA-NIRO. **IC/FIC Batch Extractor**. Disponível em: <[http://www.niro.com/niro/cmsresources.nsf/filenames/Instant-coffee-extractor.pdf/\\$file/Instant-coffee-extractor.pdf](http://www.niro.com/niro/cmsresources.nsf/filenames/Instant-coffee-extractor.pdf/$file/Instant-coffee-extractor.pdf)>. Acesso em: 31 maio. 2013.

GUTIERREZ, C. et al. **Análisis por MEB de la Porosidad del Café Tostado** ASIC - 15 Colloque. **Anais...**1993

ICO. **International Coffee Organization**. Disponível em: <<http://www.ico.org/historical/2010-19/PDF/TOTPRODUCTION.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

ISO 11292. *Instant coffee determination of free and total carbohydrate content - method using high performance anionic exchange chromatography*.

KASAI, N. et al. Efficient digestion and structural characteristics of cell walls of coffee beans. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6336–42, 23 ago. 2006.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector : a review. v. 77, p. 215–227, 2001.

KIEFER, S. **Jacu Bird Coffee**. Disponível em: <<http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=31146>>. Acesso em: 21 fev. 2010.

LELOUP, V.; LIARDON, R. **Analytical Characterization of Coffee Carbohydrates** ASIC. **Anais...**Montpellier: ASIC, 1993.

LUONTERI, E. et al. Purification and characterization of Aspergillus β -D-galactanases acting on b-1,4- and b-1,3/6-linked arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 155–168, 2003.

MAEHASHI, K.; HUANG, L. Bitter peptides and bitter taste receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 1661–1671, 2009.

MAHENDRAN, T. et al. New insights into the structural characteristics of the arabinogalactan-protein (AGP) fraction of gum arabic. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9269–76, 8 out. 2008.

MAPA. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Café Beneficiado Cru**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?journal=1&pagina=4&data=13/06/2003>>.

MARTINEZ, L. F.; BALADAN, M. O. **Quality Enhancement of Coffee Beans by Acid and Enzyme Treatment**.USAPatent US 20009/0220645 A1, 2009.

MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIDU, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45–58, set. 2012.

NATTORP, A. **Kinetics of the Hydrolysis of Mannan in Plant Materials and in Solution. Experimental Study and Mathematical Modeling**. [S.l.] EPFL - Lausanne: Switzerland, 2000.

NICOLAS, P. et al. **Hydrolysis of the Galactomannans of Coffee Extract with Immobilized beta-mannanase.**, Patent US 005714183A, , 1998.

- OOSTERVELD, A. et al. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 285–296, 2003.
- OSAMU, K.; HIROSHI, H.; YOSHIYUKI, K. **METHOD FOR CONCENTRATING EXTRACTED SOLUTION OF COFFEE.**, Patent JP2003144051 (A), , 2003.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIDA, U. F. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesq. agropec. bras.**, v. 46, n. 1, p. 912–919, 2011.
- SILVER, R. S. et al. **Enzyme-assisted soluble coffee production** .,Patent EP 1 745 702 A1, 2007.
- SIMPSON, R. J.; NEUBERGER, M. R.; LIU, T. Y. Complete Amino Acid Analysis of Proteins from a Single Hydralysate. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 1936–1940, 1976.
- SIVETZ, M.; DESROSIER, N. W. **Coffee Technology**. [S.I.] AVI Pub. Co., 1979.
- SLUITER, A. et al. **Determination of Extractives in Biomass**. [S.I: s.n.]. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42619.pdf>>.
- SOUZA, A. S. et al. **Café Solúvel Brasileiro e o aquecimento do Robusta**. Disponível em: <<http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=48512>>. Acesso em: 30 maio. 2013.
- STRAND, O. **One of the World's Most Expensive Coffees**. Disponível em: <<http://dinersjournal.blogs.nytimes.com/2010/08/11/one-of-the-worlds-most-expensive-coffees-now-in-new-york-for-sale-or-for-free/>>. Acesso em: 21 ago. 2010.
- TORRES-MANCERA, M. T. et al. enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp.pdf. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 49, n. 3, p. 369–373, 2011.
- VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do Índice de Retenção Linear para a Caracterização de Compostos Voláteis em Café Solúvel Utilizando GC-MS e Coluna HP-INNOVAX. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2031–2034, 2007.