

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

Filipe do Carmo Aleixo de Sousa

**AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE E DOS ASPECTOS NUTRICIONAIS E
ANTINUTRICIONAIS DOS EXTRATOS COMERCIAIS DE CAFÉS VERDE**

Rio de Janeiro
2018

Filipe do Carmo Aleixo de Sousa

AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE E DOS ASPECTOS NUTRICIONAIS E
ANTINUTRICIONAIS DOS EXTRATOS COMERCIAIS DE CAFÉS VERDE.

Dissertação de mestrado –
Programa de Pós-Graduação em Alimentos
e Nutrição da Universidade Federal
do Estado do Rio de Janeiro, com requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Alimentos e Nutrição.
Orientador: Prof. Dr. Otniel Freitas-Silva

RIO DE JANEIRO
2018

Filipe do Carmo Aleixo de Sousa

**AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE E DOS ASPECTOS NUTRICIONAIS E
ANTINUTRICIONAIS DOS EXTRATOS COMERCIAIS DE CAFÉS VERDE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Alimentos e
Nutrição da Universidade Federal do Estado
Do Rio de Janeiro

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Otniel Freitas Silva
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Dr. Ricardo Felipe Alves Moreira
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Dr. César Luis Siqueira Junior
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Dedico este trabalho à todos que me acompanharam em minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de Agradecer ao supremo Deus por me conceder a vida.

Agradeço a Meishu Sama por me trazer conforto, abrir meus olhos para uma nova vida, me ensinar sobre gratidão e altruísmo.

A toda a minha família que sempre me apoiou em todos os momentos e, em especial a minha mãe que sempre foi minha maior apoiadora e admiradora.

Agradeço ao Lucas por todo o companheirismo ao longo do tempo, por ouvir meus desabaços e medos e por entender minhas ausências.

Ao meu primo João que me ajudou e apoiou desde o processo seletivo do trabalho

Ao Douglas e a loja 1985dD pela confecção da camisa usada no dia da defesa.

A meus amigos da faculdade que por mais que não estejamos perto fisicamente, a afinidade e admiração que eu tenho por cada um deles continua, em especial à Paula pela ajuda na elaboração dos gráficos.

A todos os meus amigos da Embrapa (Érika, Ana Paula, Carla, Gabriela, Carol Beres, Leilson, Maraysa, Aline e Diego) que viveram comigo todas as emoções do mestrado. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Obrigado por todo o conhecimento compartilhado, pelas dicas e, principalmente, pelos momentos de descontração com o nosso café na copa da engenharia.

Ao meu orientador. Dr Otniel, por todo apoio, compreensão, e positividade que foram tão essenciais para a elaboração deste trabalho.

A Cinthia por toda a troca de conhecimento científico sobre café e por toda conversa.

A todos os funcionários da Embrapa dos laboratórios de Micologia, Fisiologia da pós colheita, bioquímica, físico química, diagnóstico molecular, cromatografia líquida e resíduos e contaminantes.

Agradeço em especial a equipe do laboratório de Diagnóstico molecular: Dra Edna, Tati, Nilda e Thiago por todo o apoio técnico.

A coordenadora do PPGAN UNIRIO, professora Édira e a todos os professores do programa.

Aos meus colegas de turma por toda a troca de experiências, conhecimento e momentos de descontração entre as aulas.

Ao professor Flávio Cardoso pela orientação no estágio em docência.

A CAPES pela concessão da bolsa e a FAPERJ pelo fomento à pesquisa.

Look out 'cause here I come
And I'm marching on to the beat I drum
I'm not scared to be seen
I make no apologies
This is me.

This is me – The Greatest Showman

RESUMO

Diversos benefícios estão sendo atribuídos ao consumo de suplementos alimentares de café verde, que estão sendo comercializados em diferentes formas, como: cápsulas, extratos líquidos ou farinha, principalmente devido ao seu alto teor de ácidos fenólicos, que supostamente apresentam atividade antioxidante, antimutagênica e anticarcinogênica in vitro. O ácido clorogênico é o composto fenólico de maior proporção em café e o consumo de extrato de café verde tem sido associado à perda de peso pela atuação dos ácidos clorogênicos e cafeína. No entanto, além destes compostos bioativos com apelo à saudabilidade e emagrecimento, devem ser considerados outros compostos presentes no café, como a presença de contaminantes como o metabólito secundário de fungos, ocratoxina A, além de fitatos e taninos, que apresentam características antinutricionais. Neste sentido este trabalho buscou avaliar a composição de suplementos alimentares de café verde, quanto sua composição centesimal, perfil de minerais, atividade antioxidante, além de verificar a autenticidade por métodos moleculares. Este trabalho teve como objetivo prover informações técnicas para uma discussão qualificada sobre a efetiva saudabilidade do consumo de produtos comerciais à base de café verde. Foram selecionadas 9 amostras de suplementos alimentares de café verde e foi elaborado um produto para servir como padrão. Foi possível identificar DNA de café em 6 das amostras comerciais de suplemento alimentar. Os produtos tiveram atividade antioxidante entre 33 e 2408 μmol de trolox/g. Foi possível identificar ácido clorogênico em todas as amostras com concentrações que variaram entre 0,023 – 20 mg/g de café.

Palavras-chave: ácido clorogênico, cápsulas de café verde, composição centesimal; autenticidade.

ABSTRACT

Several benefits have been attributed to the consumption of green coffee dietary supplements, which are being commercialized in different forms, such as: capsules, liquid extracts or flour, mainly because of its high phenolic acid content, which supposes to have antioxidant, antimutagenic and anticarcinogenic activities in vitro. Chlorogenic acid is the major phenolic compound in coffee and the consumption of green coffee extract has been associated with weight loss through the action of chlorogenic acids and caffeine. However, besides these bioactive compounds with appeal to health and weight loss, other compounds presented in coffee should be considered, such as the presence of contaminants like the secondary metabolite of fungi, ochratoxin A. In addition to the presence of phytates and tannins, which have antinutritional characteristics. For the aforementioned reasons, this work sought to evaluate the composition of green coffee dietary supplements, as well as its centesimal composition, mineral profile, antioxidant activity. Besides verifying the authenticity through molecular methods, as well as its nutritional and antinutritional aspects. The work had the intention to provide technical information for a qualified discussion about the effective health of the consumption of commercial products based on green coffee. Nine samples of green coffee dietary supplements were selected and a product was elaborated to work as a standard. It was possible to identify coffee DNA in 6 commercial dietary supplement samples. The products had antioxidant activity between 33 and 2408 $\mu\text{mol trolox} / \text{g}$. It was possible to identify chlorogenic acid in all the samples with concentrations which varied between 0.023 - 20 mg/g coffee.

Keywords: chlorogenic acid, green coffee capsules, Centesimal composition and authenticity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Produtos Comerciais à base de café verde	14
Figura 2 - Aparelho de Ultrassom de ponteira com amostra submersa em banho de gelo para extração dos compostos bioativos	26
Figura 3 - Equipamento <i>Spray Dryer</i>	28
Figura 4 - Transiluminador UV com gel de agarose	31
Figura 5 - Termociclador acoplado à computador com software para coleta e análise de dados.....	33
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose	40
Figura 7 - Curva de amplificação das amostras 3 e 9 e Controle positivo.....	41
Figura 8 - Curva de temperatura de <i>melting</i> das amostras 1, 5 e 7, respectivamente.	41
Figura 9 - Atividade antioxidante de suplementos alimentares de café verde	47
Figura 10 - Concentração de cafeína em amostras de suplemento alimentar de café verde.	48
Figura 11 - Concentração de ácido clorogênico em amostras de suplemento alimentar de café verde.	49
Figura 12 - Crescimento de fungos das seções Nigri e Circumdati, respectivamente, no produto comercial 7	50
Figura 13 - Crescimento de Black Aspergillus da seção Nigri no produto comercial 8.	51
Figura 14 - Cromatograma evidenciando contaminação por OTA na amostra 2.....	52
Figura 15 - Cromatograma com Ponto 7 da curva padrão de OTA.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alimentos e embalagens isentos ou não da obrigatoriedade de registro sanitário de acordo com a RDC 27/2010	16
Tabela 2 - Principais componentes do grão de café verde (p/p% peso seco) 18	
Tabela 3 - Aminoácidos livres em amostras de café verde (p/p%)	19
Tabela 4 - Características dos produtos comerciais usados no trabalho de acordo com rotulagem	29
Tabela 5 - Condições de Mix para PCR	30
Tabela 6 - Condições Eletroforéticas para análise dos produtos de PCR.....	31
Tabela 7 - Mix reação de PCRrt (PCR tempo Real).....	32
Tabela 8 - Composição centesimal dos suplementos alimentares de café verde.....	42
Tabela 9 - Composição centesimal de pó de café torrado e moído	43
Tabela 10 - Composição centesimal em amostra de café verde.....	44
Tabela 11 - Composição mineral de suplementos alimentares de café verde	44
Tabela 12 - Composição mineral em amostras de café cru	45
Tabela 13 - Composição mineral em amostras de café verde	45
Tabela 14 - Concentração de fitatos nas amostras de suplementos alimentares de café verde.....	46
Tabela 15 - Diversidade micologica das amostras	50
Tabela 16 - concentração de OTA em amostras de suplementos alimentares de café verde.....	52

LISTA DE SIGLAS

ECV – Extrato de Café Verde

OTA - Ocratoxina A

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio / Cetyl trimethylammonium bromide

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCRrt – Reação em cadeia da Polimerase em tempo real

Primers - Oligonucleotídeos iniciadores

Tm - temperatura de dissociação (*melting temperature*)

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	COMPOSIÇÃO DO CAFÉ VERDE	17
3.2	O CAFÉ VERDE NO CONTROLE DO PESO CORPORAL	19
3.3	ÁCIDOS CLOROGÊNICOS	21
3.4	CAFEINA	22
3.5	OCRATOXINA A	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	OBJETIVO GERAL	25
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	PRODUTOS À BASE DE CAFÉ VERDE	26
5.2	EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DOS PRODUTOS COMERCIAIS	26
5.3	PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE CAFÉ VERDE (ECV):	27
5.3.1	Extração dos compostos bioativos	27
5.3.2	Análise de sólidos solúveis	27
5.3.3	Secagem por atomização	27
5.4	ANÁLISES DE AUTENTICIDADE DOS PRODUTOS COMERCIAIS	28
5.4.1	Extração de DNA	30
5.4.2	Quantificação de DNA	30
5.4.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	30
5.4.4	Eletroforese em gel de agarose	31
5.4.5	Análise de PCR-rt	32
5.5	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL PARA ROTULAGEM	33
5.5.1	Umidade	33
5.5.2	Cinzas	33
5.5.3	Extrato Etéreo	33
5.5.4	Fibras	34
5.6	MINERAIS	34
5.7	FITATOS	34
5.8	TANINOS TOTAIS	35
5.9	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO	36

5.10.1 ORAC	36
5.10 CAFEÍNA	37
5.11 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS	37
5.12 ANÁLISE MICOLÓGICA.....	38
5.13.1 Identificação dos isolados fungicos	38
5.13 OCRATOXINA A.....	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 PRODUÇÃO DO ECV	40
6.2 AUTENTICIDADE DOS PRODUTOS COMERCIAIS	40
6.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL PARA ROTULAGEM	42
6.4 COMPOSIÇÃO MINERAL.....	44
6.5 FITATO	46
6.6 TANINOS	46
6.7 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	46
6.8 CAFEINA.....	47
6.9 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS	48
6.10 DIVERSIDADE FUNGICA.....	49
6.11 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FUNGICOS.....	50
6.12 OCRATOXINA A	51
7. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo, seguido da água. Nos últimos anos, o desenvolvimento de estudos sobre a atividade biológica dos constituintes do grão verde e da bebida tem sido mais incentivado e explorado (LIMA et al., 2010). Os grãos de café verde diferem na composição química segundo a espécie e origem. São constituídos de polissacarídeos, lipídeos e proteínas em sua maioria, além de componentes secundários, tais como: cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos, açúcares livres (principalmente sacarose), aminoácidos livres, diterpenos, melanoidinas, entre outros (FARAH & SANTOS, 2015). No entanto, durante o processo de torrefação do café, várias reações químicas ocorrem ao mesmo tempo, a partir das quais alguns compostos são degradados, como proteínas, polissacarídeos, e ácidos clorogênicos. Além disso, os açúcares e a trigonelina atuam como precursores de substâncias envolvidas no sabor e aroma da bebida (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

O Brasil é o principal produtor e exportador de café em todo o mundo, produzindo em 2017 cerca de 51,5 milhões de sacas de café no total, deste total 30,7 milhões de sacas foram destinadas à exportação, representando cerca de 60% da produção. A queda da produtividade em relação ao ano de 2016 causada por condições climáticas não alterou a posição do Brasil no ranking de produtores de café no mundo, seguido do Vietnã com produção de 28,5 milhões de sacas (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ, 2017; CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL, 2017).

As espécies de café de maior importância comercial são: *Coffea arabica* (café arábica), responsável por cerca de 58% da comercialização mundial e *Coffea canephora* (café robusta) que responde pelos outros 42%, porém existe no mundo quase cem espécies de café (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2015/16). Estas espécies possuem composição química e características físico-químicas bem diferenciadas, que produzem bebidas com características sensoriais bastante distintas (CLARKE, 1987). O café arábica é conhecido pela excelente qualidade da bebida, porém possui maior suscetibilidade a doenças e pragas. Em contraste, o café robusta, embora não valorizado pela sua qualidade sensorial, tem melhor capacidade de adaptação aos estresses do campo e é mais rico em compostos antioxidantes, como o ácido clorogênico (HENDRE; AGGARWAL, 2014). Pela melhor qualidade sensorial a espécie *Coffea arabica* possui valor comercial mais elevado, sendo o preferido pelos consumidores (MONAKHOVA et al., 2015). Por isso, seu preço no mercado pode ser cerca de 200% superior.

Tendências atuais de produção e consumo de alimentos contendo antioxidantes naturais atendem não só ao interesse de conferir maior proteção aos componentes dos alimentos afetados pela oxidação, mas também a obtenção de produtos com propriedades funcionais que irão atuar na saúde do consumidor. Diferentes compostos presentes no café apresentam efeito quimioprotetor em sistemas químicos e biológicos, justificado pela presença de antioxidantes, como os ácidos clorogênicos (LIMA et al., 2010). Uma xícara da bebida do café torrado é rica em diferentes e complexas substâncias bioativas, que podem apresentar atividade

antioxidante, sendo a bebida uma importante fonte do consumo de antioxidantes naturais (GAASCHT; DICATO; DIEDERICH, 2015).

Além do consumo da bebida de café predominantemente com a infusão de café torrado e moído, ultimamente o extrato de café verde (ECV) comercializado sob diferentes formas, como capsulas, farinhas ou extrato líquido (Figura 1), tem conquistado uma fatia do mercado pelo apelo de saudabilidade, pois contém de 6 a 12% de ácidos clorogênicos, dos quais durante o processo de torrefação do grão sofre degradação de uma parcela dos mesmos, para o preparo da bebida tradicional (ADRIANA FARAH et al., 2005). O consumo de ECV surgiu com o objetivo de perda de peso pelo efeito termogênico do café. Estudos como o de Dellalibera; Lemaire; Lafay (2006) demonstraram que o consumo de ácido clorogênico contribui para a perda de peso. Segundo Shimoda; Seki; Aitani (2006), o consumo de ácido clorogênico como substância isolada não suprime o ganho de peso em ratos, isto é, o estudo sugere que para suprimir o ganho de peso é necessária a sinergia entre as substâncias presente no café verde, tais como a cafeína, o ácido clorogênico, além de outros componentes fenólicos



Figura 1 - Produtos Comerciais à base de café verde

Embora os ácidos clorogênicos estejam presentes em várias plantas, o grão de café verde é uma das principais fontes, destacando-se a espécie *C. canephora* que pode apresentar até três vezes mais ácidos clorogênicos que a *C. arabica* (NARITA; INOUE, 2015). Além disso, o ácido clorogênico, presente em grãos de café, é altamente biodisponível para o corpo humano (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009), o que poderá contribuir para que o extrato de café seja utilizado com sucesso na suplementação alimentar.

Dos diversos benefícios que estão sendo creditados ao consumo de ECV, há poucos relatos na literatura sobre a composição destes extratos comerciais. No

rótulo das embalagens raramente é citado sobre a espécie utilizada para obtenção do produto, *C. arabica* ou *C. canephora*.

Alguns autores (GAASCHT; DICATO; DIEDERICH, 2015; REVUELTA-INIESTA; AL-DUJAILI, 2014; YASHIN et al., 2013) afirmam que além da perda de peso, o consumo de café verde pode contribuir para a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anticarcinogênica, antipirética, entre outras, principalmente devido ao seu alto teor de ácidos fenólicos, especialmente os ácidos clorogênicos (WEI & TANOKURA, 20015; NARITA & INOUE, 2015). O papel de antioxidantes dietéticos e seus benefícios para a saúde têm atraído grande atenção nos últimos anos, especialmente aqueles extraídos de plantas (LIMA et al., 2010). O interesse pela descoberta de antioxidantes novos e seguros de fontes naturais tem aumentado, principalmente para prevenir o dano oxidativo às células vivas. O uso de antioxidantes sintéticos tem diminuído devido à suspeita de que tenham atividade como promotores de carcinogênese e a busca por antioxidantes naturais.

O composto mais abundante presente em café é a cafeína, conhecida por sua habilidade de aumentar a pressão sanguínea, ser termogênica, além de atuar como psicoestimulador e ter propriedades diuréticas. A cafeína é uma xantina alcalóide, um metabólito secundário derivado da guanina e é similar à teobromina que também está presente no café assim como no chá e cacau (MEJIA; RAMIREZ-MARES, 2014; WRIGHT et al., 2013).

Além dos compostos benéficos à saúde presentes no café, deve-se, no entanto considerar que esta matéria prima também pode conter substâncias antinutricionais e contaminantes, como a presença de ocratoxina A (OTA), Fitatos e resíduo de pesticidas (CONNELLY, 2011; VACLAVIK et al., 2013; REIS et al., 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Para além do consumo da bebida de café predominantemente com a infusão de café torrado e moído, ultimamente o extrato de café verde tem conquistado uma fatia do mercado pelo apelo de saudabilidade, principalmente no âmbito das dietas e suplementos alimentares recomendados em academias por conter os ácidos clorogênicos em maior abundância em relação à bebida tradicional. Desta forma é fundamental a caracterização adequada das matérias primas utilizada bem como do próprio preparo dos extratos de café verde a fim de elucidar a segurança efetiva do uso destes extratos quanto aos componentes nutricionais e antinutricionais presentes nos ECV.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através da Resolução da Diretoria Colegiada 27/2010 (RDC 27/2010), dispõe sobre alimentos e embalagens isentos ou com obrigatoriedade de registro sanitário, e o café verde enquadra-se neste regulamento.

Dentre uma lista com diversos alimentos e suplementos alimentares, os produtos de ECV em forma de capsulas, farinhas ou extrato líquido, por sua composição, se enquadram dentro do código 4300032 ou 4300090, listados na Tabela 1, porém para fugir da necessidade de registro, algumas empresas rotulam o produto como suplemento vitamínico (código 4300041), no entanto o marketing em torno do produto é relacionado a um alimento com propriedades funcionais ou de suas substâncias bioativas.

Tabela 1 - Alimentos e embalagens isentos ou não da obrigatoriedade de registro sanitário de acordo com a RDC 27/2010

Código	Categoria	Necessidade de registro
4200038	Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	Não
4300083	Alimentos para controle de peso	Não
41000166	Café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis	Não
4300041	Suplemento vitamínico ou mineral	Não
4300032	Alimentos com alegações de propriedade funcional e ou de saúde	Sim
4300090	Substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e ou de saúde	Sim

Fonte: Adaptado da RDC 27/2010 (ANVISA)

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 COMPOSIÇÃO DO CAFÉ VERDE

As espécies arábica e robusta possuem composição diferenciada, tendo como principais componentes os polissacarídeos, as proteínas e os lipídeos. Os componentes menores, como cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos, açúcares livres, aminoácidos livres, especula-se que sejam os responsáveis pelo aroma do café (WEI & TANOKURA, 2015).

Os polissacarídeos representam cerca de 50% do peso do grão de café verde, que correspondem em sua maioria celulose, mananas, arabinogalactanos, enquanto que entre os açúcares simples, o que mais se destaca é a sacarose (Tabela 2) (NUNES; COIMBRA, 2001).

O teor de trigonelina é maior em *C. arabica* que em *C. canéfora*. A administração de trigonelina em ratos diabéticos pode evitar danos a órgãos relacionados à diabetes (WEI & TANOKURA, 2015).

O café verde junto a outras frutas e hortaliças são considerados fontes de ácido clorogênico (Tabela 2), um dos polifenóis mais abundantes. Os ácidos clorogênicos pertencem à família dos ácidos trans hidroxicinâmicos, formados por ácido quínico e certos ácidos trans-cinâmico (cafeico, p-cumárico, e ácido ferúlico). No café verde esse éster pode ser encontrado como isômeros de ácidos cafeoilquínicos: ácido-5-O-cafeoilquínico, ácido-4-O-cafeoilquínico e ácido-3-O-cafeoilquínico (WEI & TANOKURA, 2015; BUDRYN et al., 2014).

Tabela 2 - Principais componentes do grão de café verde (p/p% peso seco)

Componentes	Autores					
	(FELDMAN; RYDER; KUNG, 1969)	(Wei & Tanokura, 2015)	(Wei & Tanokura, 2015)	(OLIVEIRA et al., 2006)	(FRANCA; MENDONÇA; OLIVEIRA, 2005)	(FRANCO, 2008)
Proteína	11,6	~12,4	~12	14,9	15,0	13,5
Lipídeos	11,4	10–14	8–10	10,8	10,4	14,35
Carboidratos	-	-	-	60,0	69,9	12,56
Hemicelulose	23	-	-	-	-	-
Celulose	12,7	-	-	-	-	-
Lignina	5,6	-	-	-	-	-
Sucrose	7,3	5,3-9,3	3,7-7,1	-	-	-
Açúcares redutores	0,7	-	-	-	-	-
Galactana	-	4-6	10-14	-	-	-
Manana	-	25-30	19-22	-	-	-
Ácidos Clorogênicos	7,6	CQA	CQA	-	-	-
Cafeína	1,2	0,6-1,5	2,2-2,8	-	-	-
Trigonelina	1,1	1,0	0,7	-	-	-
Flavan	-	9-13	6-8	-	-	-
Caveol	-	0,7-1,1	Nd	-	-	-
Minerais	-	~4	~4	-	-	-

Fonte: adaptado de Feldman; Ryder; Kung, (1969); Wei & Tanokura, (2015); Oliveira et al., (2006); Franca; Mendonça; Oliveira, (2005); Franco, (2008).

Na Tabela 3 são apresentados os teores de aminoácidos livres em amostras de café verde: alanina (Ala), glicina (Gly), valina (Val), prolina (Pro), leucina (Leu), isoleucina (Ile), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), metionina (Met), fenilalanina (Phe), lisina (Lis), ornitina (Orn), tirosina (Tir), triptofano (Trp), serina (Ser), treonina (Tre), cisteína (Cis), taurina (Tau), cistationina (Cist), citrulina (Cit). Ainda, o ácido L-pipecólicas (Pip) e o ácido gama-aminobutírico (GABA). As proteínas, os peptídeos e os aminoácidos livres junto à sacarose presentes no café verde são considerados os precursores do *flavor* do café, formado através da reação de Maillard (WEI & TANOKURA, 2015).

O teor de aminoácidos livres é semelhante nos três estudos e ainda compatível com a literatura, sendo alanina, prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina e triptofano os aminoácidos mais abundantes (CASAL et al., 2003). Ressalta-se que pessoas que possuem fenilcetonúria devem ter cuidado ao consumir café verde, pois contém o aminoácido fenilalanina.

Tabela 3 - Aminoácidos livres em amostras de café verde (p/p%)

Compo nentes	Autores		
	(Casal et. a., 2003)	(Casal et al., 2003)	(Wei & Tanokura, 2015)
Espécie	<i>C. canephora</i>	<i>C. arabica</i>	<i>C. arabica</i>
Ala	0,04	0,03	0,05
Gly	0,01	0,01	0,01
Val	0,01	0,01	0,01
Pro	0,03	0,03	0,03
Ile	0,01	0,01	0,01
Leu	0,01	0,01	0,01
Asp	0,05	0,05	0,05
Glu	0,09	0,13	-
Met	0,00	0,00	Traços
Phe	0,03	0,02	0,02
His	0,01	0,01	0,01
Orn	0,00	0,00	-
Lis	0,01	0,01	0,01
Tir	0,01	0,01	0,01
Trp	0,03	0,02	0,01
(Pip)	0,00	0,01	-
(GABA)	0,08	0,06	0,05
Ser	-	-	0,03
Arg	-	-	0,01
Tre	-	-	0,01
Cis	-	-	Traços
Tau	-	-	Traços
Cist	-	-	Traços
Cit	-	-	Traços

Fonte: Adaptado de Casal et al., 2003 e Wei & Tanokura, 2015

3.2 O CAFÉ VERDE NO CONTROLE DO PESO CORPORAL

O sobrepeso e a obesidade tornaram-se um grave problema de saúde. Inúmeras estratégias vêm sendo utilizadas para perda de peso. O mercado de suplementos para perda de peso apresenta grande variedade de produtos. Recentemente o extrato de café verde tem sido comercializado como um desses

produtos. O efeito de perda de peso pode ser atribuído a cafeína e outras substâncias farmacologicamente ativas (ONAKPOYA; TERRY; ERNST, 2011).

Estudos como o de Dellalibera, Lemaire e Lafay (2006) e Thom, (2007) demonstraram que o consumo de 45 a 50% (presente em cerca de 400-1000 mg de extrato de grão de café verde) de ácido clorogênico por dia contribui para a perda de peso. Segundo Shimoda, Seki e Aitani (2006), o consumo da substância isolada de ácido clorogênico não suprime o ganho de peso em ratos. Isto é, o estudo sugere que para suprimir o ganho de peso é necessário a sinergia entre as substâncias presentes no extrato de café verde, como, a presença de cafeína, ácido clorogênico e outros componentes fenólicos.

De acordo com Tanaka et al., (2009) o extrato de café verde parece diminuir os níveis de gordura corporal e triglicérides plasmáticos, através da redução da síntese de ácidos graxos. O consumo de extrato de café verde tem sido associado à inibição da lipase pancreática, o que reduz a hidrólise lipídica, e por consequência a absorção de lipídeos, melhorando as concentrações pós-prandiais de triglicérides plasmáticos, colesterol e ácidos graxos livres (LI KWOK CHEONG et al., 2014a; NARITA; INOUE, 2012; OCHIAI et al., 2004; TANAKA et al., 2009)

Flanagan et al., (2014) reportaram a atividade lipolítica dos ácidos clorogênicos, administrando diferentes dosagens de Svetol (extrato de café verde descafeinado) 0,04, 0,2 and 1 mg/mL e 1mM de cafeína (0,194 mg/mL) como controle positivo. Foi analisada a liberação de ácidos graxos livres em 2 h e 192 h de adipócitos extraídos da pele do abdômen de uma voluntária saudável. Os resultados obtidos mostraram que houve atividade lipolítica no tempo curto (2h), o que pode ser explicado por resíduos de cafeína na amostra. Também foi observada atividade lipolítica em *long-term* (192h), até mesmo na menor dosagem administrada de svetol.

O consumo de bebidas enriquecidas com ácido clorogênico auxilia na redução de gordura visceral e perda de peso. Segundo Watanabe et al., (2014) em um estudo com 25 mil participantes selecionados, homens e mulheres foram voluntários para consumir uma bebida contendo 270mg de ácido clorogênico e anotar diariamente seu peso. Após 4 semanas de consumo da bebida, o estudo contava com 16 mil participantes que haviam perdido em média 0,5kg. Ao final de 12 semanas, permaneceram 1659 voluntários com média de perda de peso em 1,06kg desde o início do experimento, entretanto, o estudo não levou em consideração se os voluntários haviam mudado seus hábitos alimentares e praticas de esporte.

Na pesquisa conduzida por Shimoda; Seki; Aitani, (2006b) onde ratos saudáveis foram submetidos a uma dieta com altas concentrações de lipídeos e suplementação com extrato de café verde foi analisado a ação dos extratos sobre o ganho de peso dos mesmos. Após 14 dias o extrato de café verde se mostrou efetivo no ganho de peso em relação ao controle. Enquanto, Cheong et al., (2014) administraram um extrato de café verde descafeinado em 30 ratos com síndrome metabólica que foram divididos em 3 grupos: Controle; dieta com altas concentrações de lipídeos e dieta com altas concentrações de lipídeos suplementada com ECV. Após 12 semanas não foi observado a redução do ganho de peso com ratos suplementados com ECV. Esses dados conflitantes demonstram que os componentes do extrato de café possivelmente agem de forma sinérgica e a

cafeína pode apresentar fator de importância na redução do aumento de peso. Além de tudo, como sugerido por Mahabir, (2014), a importância de um estudo amplo com metodologia adequada sobre a ação do extrato de café verde na saúde.

3.3 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

Os ácidos hidroxicinâmicos estão em sua forma livre nas células e sua ocorrência pode ser conjugada de derivados glicosilados. Os ésteres formados entre os ácidos hidroxicinâmicos e quínicos são agrupados com o nome genérico de ácidos clorogênicos (CAMPA et al., 2012; HERRMANN; NAGEL, 1989).

O ácido clorogênico possui alto teor de conjugados de cinamato, além de ser um dos grupos mais importantes de compostos fenólicos, presente em diversas plantas (BUDRYN et al., 2014; CLIFFORD; KNIGHT, 2004). Os efeitos fisiológicos dependem da quantidade que cada planta acumula. O café verde é considerado uma fonte de ácido clorogênico (5–12 g/100 g), cerca de 5 a 10% desse composto (BUDRYN et al., 2014; FARAH et al., 2008).

Segundo Farah et al. (2008) e Monteiro et al., (2007) os principais compostos do ácidos clorogênicos são hidrolisados através da ação enzimática de esterases nos intestinos delgado e grosso para a forma de ácido cafeico e quínico, sendo altamente biodisponíveis em seres humanos, sendo absorvido e/ou metabolizado no trato gastrointestinal. Os estudos ressaltam a variação inter-individual na absorção de ácido clorogênico e a principal via de excreção não é urinária, necessitando de maiores investigações. Farah et. al (2008) analisou a bioavaliabilidade dos ácidos clorogênicos em humanos e percebeu que 30% dos ácidos cinâmicos foram recuperados no plasma, incluindo seus metabólitos (pequenas concentrações de ácidos cafeico, ferulico, isoferulico e p-coumaric foram identificados no plasma de diferentes indivíduos) em até 8h após a ingestão de capsula contendo 0,4g do extrato de café atomizado em spray dryer.

Murase et al., (2012) administrou dosagens de polifenóis purificados de café (ácidos cafeoilquínicos (CQA), di-CQA, ácidos feruloyl quinico (FQA)) misturados na ração composta por sucrose e amido em ratos. Esses extratos suprimiram o aumento da concentração dos níveis de glicose e insulina, sugerindo que o extrato de polifenóis de café modulam a oxidação do substrato suprimindo hiperglicemia e hiperinsulinemia por inibição das enzimas digestivas. Estes dados refutam que o consumo de café pode ser um aliado no combate da obesidade.

Ludwig et al., (2014) ressalta que existem várias evidências em estudos dos efeitos protetivos *in vitro* e *ex vivo* de ácidos clorogênicos, entretanto, estudos devem respeitar as reais concentrações de bebidas compostas de ácidos clorogênicos para avaliação do real potencial.

O consumo de extrato de café verde tem sido associado à inibição da lipase pancreática, o que reduz a hidrólise lipídica, e por consequência a absorção de lipídeos, melhorando as concentrações pós-prandiais de triglicérides plasmáticos, colesterol e ácidos graxos livres, o que contribui para a redução da obesidade, provavelmente pela supressão do acúmulo de triglicerídeos. O ácido clorogênico é metabolizado em ácido ferúlico no fígado e rim, e este tem ação no óxido nítrico

proveniente do endotélio vascular, modulando a função vasodilatadora e vasoconstrictora e consequentemente reduzindo a pressão arterial (NARITA et al., 2012; TANAKA et al., 2009).

No estudo de Cai et al., (2014) foi verificada a ação do ácido clorogênico na formação de acrilamida, contaminante alimentar formado durante a reação de Maillard em processo de alta temperatura. Em concentração moderada (50 μ mol/mL) de ácido clorogênico houve aumento na formação de acrilamida e inibição da sua eliminação, sugerindo que alguns compostos fenólicos podem aumentar a formação de acrilamida. Entretanto, quando o ácido clorogênico foi convertido a quinona, a formação de acrilamida foi menor em comparação ao controle.

Tajik et al., (2017) após uma revisão sistemática reportaram que os efeitos dos ácidos clorogênicos na dieta podem trazer benefícios a condições como: doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e obesidade. Focando nos benefícios relacionados à ganho de peso e obesidade, os ácidos clorogênicos atuam das seguintes formas:

1- Os resultados obtidos por Rodriguez ; Hadley; Sotillo, (2006) indicaram que os efeitos dos ácidos clorogênicos em ratos obesos são similares ao da metformina, atuando como sensibilizador da insulina para diminuição dos níveis de glicose no sangue.

2 - Segundo (Henry-Vitrac et al., (2010), o ácido clorogênico atua inibindo a ação de glucose-6-fosfatase, impedindo a última etapa da glicogenólise, que transforma a glicose-6-fosfato em glicose, aumentando assim a glicemia podendo ter como consequência um efeito antidiabético. O excesso de glicose no sangue é utilizado na síntese de gordura. Assim, se ocorre inibição dessa enzima, não há aumento nos depósitos de gordura, no entanto estes são utilizados para produzir energia, o que pode ocasionar a perda de peso.

3- Diminuição do aporte calórico inibindo a ação da amilase (Narita & Inoue 2009).

4- Aumento da atividade lipolítica no tecido adiposo, a partir de testes *in vitro* realizado por Flanagan et al (2014).

3.4 CAFEINA

A Cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é o estimulante fisiológico mais consumido mundialmente, além de ser o composto bioativo mais conhecido no café é a cafeína, conhecida por sua habilidade de aumentar a pressão sanguínea, atuar como psicoestimulador, termogênico, além de estar relacionada com um efeito positivo na memória de longo prazo e ter propriedades diuréticas. É uma xantina alcaloide, metabólito secundário derivado da guanina e é similar à teobromina que também está presente no chá, cacau e café (DE MEJIA; RAMIREZ-MARES, 2014; WRIGHT et al., 2013; ZULLI et al., 2016). Entretanto, a dosagem correta atrelada aos efeitos benéficos da cafeína ainda não está elucidada na literatura, o que pode ser respondido por diferenças de população. Altas doses de cafeína podem ter como efeito colateral sintomas como: agitação, ansiedade, arritmia, diurese, dor de cabeça, insônia,

vômitos e ainda resultar em liberação de catecolamina, responsável pela desregulação do equilíbrio ácido/base, glicose sérica e potássio sérico, que poderia causar complicações cardíacas (BUCHANAN; BECKETT, 2013; ZULLI et al., 2016)

No entanto, na revisão de literatura de Turnbull et al., (2017) e corroboração de Nieber (2017) foi ressaltado que o consumo moderado de cafeína na faixa de 100 a 400 mg/dia exerce função protetiva às doenças cardiovasculares. Além de não estar associado à hipertensão em populações saudáveis, no entanto, populações com risco à hipertensão, ou hipertensivos, tiveram aumento agudo na pressão sanguínea ingerindo doses moderadas de cafeína. Diversos suplementos alimentares têm sido colocados no mercado e seus efeitos colaterais negativos vêm sendo reportados, pois esses produtos podem apresentar altas concentrações de cafeína devido a sua composição de extratos herbáceos variados que são ricas fontes de cafeína (GURLEY; STEELMAN; THOMAS, 2015).

Após a ingestão, a absorção da cafeína é dada entre 30 e 45 minutos a partir do estômago, sendo que 90% dela é absorvida após 20 minutos da ingestão. O pico de concentração no plasma sanguíneo é alcançado entre 1-1,5 h a partir da ingestão, podendo variar conforme idade, gênero e chegando até 11h para o pico máximo de concentração em gestantes (MEJIA; RAMIREZ-MARES, 2014).

Segundo os dados de uma meta-análise de Hernán et al., (2002) existe uma relação inversa entre o consumo de café e a ocorrência da doença de Parkinson que é uma desordem neuropatológica envolvendo a degeneração de neurônios dopaminérgicos. A cafeína presente no café se mostra como um protetor contra a neurotoxicidade em modelos animais, além disso, pode estar associada ao decréscimo do risco de doença de Parkinson e diabetes tipo 2, por outro lado, o consumo de cafeína pode estar associado com aumento da pressão sanguínea e aumento do risco de perda de gravidez (CHEN et al., 2001; GROSSO et al., 2017).

Turnbull et al. (2017) ressaltam que indivíduos habituados com o consumo de produtos que contenham cafeína tornam-se mais tolerantes aos efeitos fisiológicos que indivíduos que não tenham o hábito de consumir cafeína. No entanto, estes fatos não significam que estes indivíduos não irão experimentar os efeitos colaterais, caso consumam esses produtos em baixas concentrações.

No estudo de Neves; Caldas (2017), quando analisaram os níveis de cafeína em suplementos alimentares para perda de peso oriundos dos Estados Unidos da América e apreendidos pela polícia federal no Brasil, identificaram nas 109 amostras que declaram a quantidade de cafeína presente no produto que cerca de 26,6% das amostras continham mais que 120% da quantidade especificada, sendo que em 47,9% do total de amostras proviam a dose máxima segura de cafeína, estabelecida em 400 mg diárias. Nesta dose a cafeína, não provoca efeitos colaterais adversos como, desordens cardiovasculares, toxicidade e problemas na absorção de cálcio.

3.5 OCRATOXINA A

Vários estudos microbiológicos mostram que os fungos *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, são contaminantes naturais dos grãos de café (BATISTA et al., 2003). A ocratoxina A (OTA) é um metabólito comumente produzido pelos fungos *Penicillium* e *Aspergillus*. Essa toxina é considerada hepatotóxica, nefrotóxica, teratogênica e carcinogênica um agente carcinogênico. Além de estar relacionada a patologias renais graves, possivelmente ligada a tumores do trato urinário (PAULINO DE MORAES; LUCHESE, 2003; VATINNO et al., 2008). A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer classificou a OTA como possível agente cancerígeno (VATINNO et al., 2008). OTA tem sido detectada em diferentes gêneros alimentícios e bebidas, processados e não processados, tais como, cereais, feijão, café, cerveja, vinho, carne, cacau, frutas secas, especiarias, nozes, leite, entre outros (BATISTA et al., 2009; HEILMANN; REHFELDT; ROTZOLL, 1999; VATINNO et al., 2008).

Segundo Batista et al., (2003), de 40 amostras de *C. arábica* brasileiras apenas cinco estavam contaminadas com OTA, cujas concentrações variaram de 0.64 a 4,14 ng/g. A União Européia estabeleceu um limite superior para café torrado de 5 ng/g, no entanto ainda não há limite determinado para café verde, pois a EFSA (2006) considera que o café não é consumido verde e a exposição a OTA está nos produtos derivados do mesmo.

Batista et al. (2009) relatam que amostras de café de varrição, que consiste na colheita do café que caiu espontaneamente das árvores e permaneceu no chão até a colheita. Essas amostras apresentam maior risco de exposição à contaminação devido ao contato da grão com solo e manuseio impróprio durante a secagem em pátios de terra. O solo é o habitat natural de fungos e outros microorganismos toxigênicos, inclusive os produtores de OTA. Foi demonstrado maior contaminação e alto teor de OTA em amostras de café varrido. O mesmo foi detectado no estudo de Noonim et al., (2008), no qual amostras de café seco da Tailândia, geralmente por secagem em piso de cimento, apresentaram concentração média de OTA maior do que a encontrada em grãos de café verde.

Amostras de café verde de diferentes países da América do Sul e Central, Ásia e África foram analisadas quanto ao teor de OTA no estudo de Romani et al., (2000). A frequência e o nível de OTA foram maiores em amostras africanas, provavelmente devido às condições climáticas e condição de processamento da colheita de café em diferentes áreas. A análise de micotoxinas como a OTA em café verde é um importante fator a ser considerado visto que o processo de torrefação pode diminuir os níveis de OTA no café.

Vaclavik et al. (2013) detectaram OTA em 18 das 50 amostras de suplementos alimentares contendo extrato de café verde. Além disso, foi encontrada ocratoxina B, um análogo da OTA, em 16 das 18 amostras.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a autenticidade dos extratos comerciais de café verde disponíveis no mercado como suplementos alimentares, seus compostos bioativos e os aspectos antinutricionais, além de obter um extrato de café verde para comparação com amostras comerciais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a autenticidade dos Extratos de café verde comerciais por técnicas de biologia molecular
- 2 Obter extrato de café verde rico em ácido clorogênico
- 3 Avaliar e comparar a composição química e biológica de extratos comerciais em relação ao extrato obtido em laboratório.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 PRODUTOS À BASE DE CAFÉ VERDE

Foram selecionados 9 diferentes produtos de suplementos alimentares comerciais à base de café verde, adquiridos diretamente do comércio varejista no Rio de Janeiro, ou pela internet na forma de cápsulas ou farinhas, exceto pelo produto de numero 9 que foi comprado nos Estados Unidos da América. O produto 10 foi elaborado neste trabalho de acordo com a metodologia descrita abaixo e estão listados na Tabela 4.

5.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DOS PRODUTOS COMERCIAIS

Foi realizada a extração dos compostos bioativos, de acordo com metodologia adaptada de Liu et al., (2010) dos produtos comerciais listados no item 5.1 da seguinte forma: Foi retirado o envoltório de cápsula das amostras que estavam nessa forma, em seguida, foi pesado em torno de 10 g das amostras em Becker de 250 mL e adicionado cerca de 150 mL de H₂O destilada (0,067 g/mL). Para extração dos compostos bioativos, amostras foram levadas ao laboratório de bioquímica na Embrapa Agroindústria de alimentos em ultrassom de ponteira Hielscher com potência de 200 watss por 10 minutos com amostra imersa em banho de gelo como está representado na Figura 2. Logo após a extração, as amostras foram levadas à centrifuga refrigerada ROTINA 38 à 7000 rpm por 14 minutos para separação da parte sólida. Em seguida, amostras foram porcionadas em alíquotas de 1,5mL e estocadas à -18°C ±2.



Figura 2 - Aparelho de Ultrassom de ponteira com amostra submersa em banho de gelo para extração dos compostos bioativos

5.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE CAFÉ VERDE (ECV):

5.3.1 Extração dos compostos bioativos

Café Robusta (*Coffea canephora*) provenientes de Espírito Santo (ES) foi moído em moedor IKA (A11) e peneirado (480-680 μm) no laboratório de micologia na Embrapa Agroindústria de alimentos. Em seguida, o extrato aquoso foi preparado no laboratório de bioquímica na Embrapa Agroindústria de alimentos de acordo com metodologia adaptada de Liu et al., (2010), utilizando uma proporção de 0,11 g/mL (massa/volume) entre café e água destilada, para extração dos compostos bioativos em ultrassom de ponteira modelo Hielscher com potência de 200W por 10 minutos com amostra imersa em banho de gelo. Logo após a extração, as amostras foram levadas à centrifuga refrigerada ROTINA 38 à 7000 rpm por 14 minutos para separação da parte sólida.

5.3.2 Análise de sólidos solúveis

A análise para determinação dos sólidos solúveis como açúcares e ácidos orgânicos, foi realizada na planta piloto I na Embrapa Agroindústria de alimentos em refratômetro eletrônico, de acordo com o método A.O.A.C., 1997. Utilizou-se água para zerar o equipamento, e em seguida, para a leitura das amostras 1 mL da suspensão foi adicionado ao leitor e os resultados lidos são expressos em °Brix.

5.3.3 Secagem por atomização

Para concentração e secagem dos compostos bioativos, amostras foram levadas à *spray dryer* de bancada modelo Buchi 190 (Figura 3) para pulverizar a amostra dentro de uma câmara com corrente de ar quente à 170°C para vaporização do solvente e transformação da amostra em pó solúvel, sendo resfriada até 90°C na saída da câmara de ar quente e com vazão de processo de 0,96 Litros/hora. A análise foi realizada na planta piloto I na Embrapa Agroindústria de alimentos.



Figura 3 - Equipamento *Spray Dryer*.

5.4 ANÁLISES DE AUTENTICIDADE DOS PRODUTOS COMERCIAIS

Métodos baseado em detecção de DNA vem sendo utilizados para avaliar a autenticidade e inocuidade de diversas matrizes alimentares (FERREIRA et al., 2016).

Para análise da autenticidade os produtos comerciais foi realizada a extração de DNA dos produtos, seguida por reação em cadeia da polimerase (PCR) para amostras que apresentaram um bom rendimento de extração de DNA e para amostras com baixo rendimento de extração foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCRrt), para identificar fragmentos de DNA específicos de café.

Tabela 4 - Características dos produtos comerciais usados no trabalho de acordo com rotulagem

Produtos de café verde										
Produto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Forma:	Cápsula	Cápsula	Cápsula	Cápsula	Cápsula	Cápsula	Cápsula	Farinha	Cápsula	Pó solúvel
Ingredientes:	óleo de gergelim, café verde em pó, cacau em pó, emulsificante lecitina de soja. Cápsula: gelificante gelatina, umectante glicerina e corantes INS 171, INS 133 e amarelo tartrazina INS 102.	Extrato de acerola, extrato de café verde (aromatizante natural), gelatina, umectante glicerina.	Extrato seco de café verde, extrato seco de chá verde e cápsula gelatinosa	Óleo de cártamo, extrato de café verde em pó (Coffea canephora Pierre, maltodextrina, antiemectante sílica), gelificante gelatina, umectante glicerina, emulsificante lecitina da soja, veículo água purificada, corantes INS 171, amarelo tartazina INS 102, INS 133 e picolinato de cromo.	Café verde (Coffea arabica). Excipiente: amido de milho. Antiemectante s: talco e dióxido de silício. Composição cápsula: gelatina, umectante glicerina.	Café verde em pó, Silício quelato, ácido ascórbico, Picolinato de Cromo, Biotina, Espessante celulose microcristalina, lubrificantes: silicato de magnésio e estereato de magnésio, antiemectante dióxido de silício, edulcorante sucralose, edulcorantes naturais: glicosídeos de steviol e taumatina, corante orgânico natural 101i	Bitartarato de colina, picolinato de cromo, magnésio, aroma natural: Café verde em pó, excipiente: silicato de magnésio, antiemectante: dióxido de silício, cápsula: gelatina, corante: amarelo 10, amarelo 6, azul brilhante	farinhas: café verde, chia, linhaça dourada, ameixa, papaia, laranja, uva, berinjela, banana, maçã, cenoura, tomate, maracujá, feijão branco, amora, gengibre, guaraná pó, psyllium, agar agar, extrato de clorofila, chás de oliveira e hibiscos.	Extrato de café verde (Coffea canephora). Outros Ingredientes: Celulose microcristalina, fosfato de cálcio dihidratado, Hidroxipropilcelulose, croscarmelose sódica, estereato de magnésio, óleo vegetal hidrogenado, dióxido de silício, revestimento de base vegetal	Café verde (Coffea canephora), Maltodextrina

5.4.1 Extração de DNA

Análise foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Murray; Thompson (1980) seguindo o protocolo de extração com tampão de lise CTAB, desenvolvido no laboratório de diagnóstico molecular da Embrapa – Agroindústria de Alimentos conforme explicação a seguir:

Para a extração de DNA é necessária uma etapa de lise térmica a 65° C na presença de CTAB, seguida por várias etapas de extração e purificação a fim de remover contaminantes como proteínas (digestão com proteinase K). Clorofórmio foi utilizado para separação dos ácidos nucleicos do CTAB e dos complexos polissacarídeos/proteínas. Por fim, os ácidos nucleicos foram purificados pela precipitação com isopropanol e lavados com etanol.

Protocolo completo de extração de DNA no ANEXO A.

5.4.2 Quantificação de DNA

Os produtos de extração de DNA foram quantificados em nano-espectrofotômetro Genova Nano (JENWAY – Stffordshire, UK) através da adição de 2µL em microcubeta para leitura em 260nm de comprimento de onda.

5.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram distribuídas em mix conforme mostra a Tabela 5 e submetidas à PCR de acordo com procedimento operacional padrão do laboratório de diagnóstico molecular no amplificador GeneAmp* PCR system 9700 e programado para 60 ciclos de 95 graus Celsius (°C) por 50 segundos para desnaturação da fita de DNA, seguido por 50 segundos à 60°C para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) CAFE1F e CAFE1R, desenvolvidos na Embrapa Agroindústria de Alimentos e 72°C por 50 segundos para amplificação do DNA, com extensão final à 4°C. Em seguida, os produtos de amplificação de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para visualização da amplificação.

Tabela 5 - Condições de Mix para PCR

Mix	Volume para 1 amostra (µL)
Tampão	5
Primer Foward	2
Primer Reverse	2
DNTP's	2
MgCl ₂	3,5
Taq Polimerase	1,5
H ₂ O MiliQ	4
DNA	30

5.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Seguindo o protocolo da Embrapa Agroindústria de alimentos, foi preparado gel com concentração de 2% de agarose conforme mostra a Tabela 6 e corado com Brometo de etídio e amostras de DNA foram coradas com azul de metileno para serem aplicadas no gel, em seguida, amostras foram foto documentadas com transiluminador UV L.PIX Molecular Imaging conforme demonstra Figura 4.

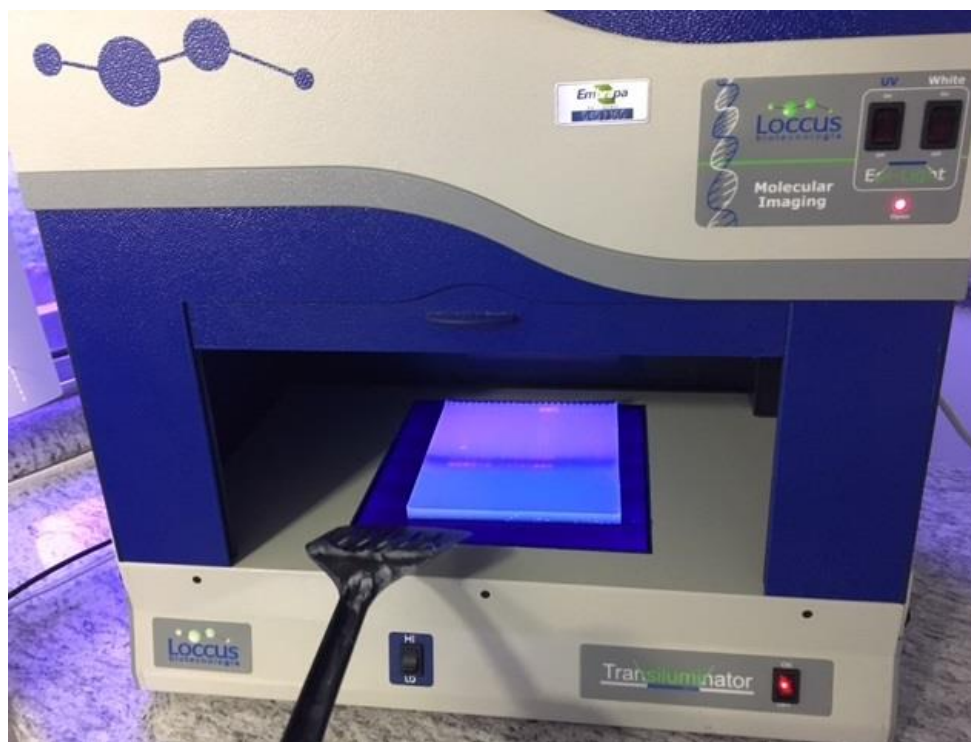


Figura 4 - Transiluminador UV com gel de agarose

Tabela 6 - Condições Eletroforéticas para análise dos produtos de PCR

Concentração do gel	2%
Agarose	5g
Tampão TBE 1x	250mL
Brometo de Etídio	12,5 µL
Diferença de Potencial	150 V
Amperagem	150 A
Tempo	120 minutos

Amostras que não foi possível visualização dos produtos de amplificação foram submetidas à reação de PCR tempo real (PCR-rt).

5.4.5 Análise de PCR-rt

A análise de PCR-rt utilizou o termociclador Abi 7500 (Applied Biosystems, USA) representado na Figura 5, utilizando o sistema SYBR Green como corante/intercalante como repórter e com par de *primers* CAFE1, específicos para DNA de café, desenvolvidos pela Embrapa Agroindústria de Alimentos.

O mix preparado para a reação era constituído de acordo com a Tabela 7

Tabela 7 - Mix reação de PCRrt (PCR tempo Real)

Mix PCRrt	
Reagente	Quantidade por amostra (µL)
SYBR Green	25
Primer Foward	1,16
Primer Reverse	1,16
DNA	22,6

Fonte: Próprio autor

O volume reacional foi de 50 µL, onde a porção de DNA correspondia por 22,6µL e o volume restante do mix reacional. Para controle negativo da análise, foi utilizada a água Milli-Q.

Após o término da reação, foram coletados e analisados os dados gerados pelo software do termociclador, tais como os gráficos com as curvas de amplificação e de dissociação (melt curve) e T_m (*melting temperature* / temperatura de dissociação) de cada réplica da reação.



Figura 5 - Termociclador acoplado à computador com software para coleta e análise de dados

5.5 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL PARA ROTULAGEM

Afim de atestar as informações na rotulagem dos produtos comerciais e de prover informações sobre a composição centesimal e valor calórico do produto desenvolvido, foram realizadas análises físico-químicas em todos os produtos no laboratório de físico-química da Embrapa Agroindústria de alimentos.

5.5.1 Umidade

A análise para determinação de umidade está intimamente ligada à vida útil do produto, visto que a preservação do alimento depende da quantidade de água presente no alimento. A determinação de umidade foi realizada por método termogravimétrico (estufa a 100 °C), onde as amostras foram deixadas em estufa por 3h para evaporação da água, em seguida, amostras foram deixadas em dessecador por 1h e pesadas em balança analítica, e levadas até estufa até atingirem peso constante de acordo com método nº 925.45 B (AOAC, 2005);

5.5.2 Cinzas

A determinação do resíduo mineral fixo das amostras foi determinada por método termogravimétrico, onde os compostos orgânicos foram transformados em CO_2 , H_2O e NO_2 em mufla (550°C) em ponto de fumaça até a coloração cinza clara e, após, levado à dessecador até peso constante, em seguida, pesado em balança analítica de acordo com o método nº 923.03 (AOAC, 2005);. A análise de cinzas é um importante parâmetro para verificação do valor nutricional de alimentos, pois o resíduo mineral fixo, constituído principalmente de K, Na, Ca, Mg, além de Al, Cu, Fe, Mn e Zn, minerais que estão envolvidos em vários processos biológicos do organismo.

5.5.3 Extrato Etéreo

O percentual de gordura é determinado pela diferença de peso das amostras após extração dos lipídeos com éter de petróleo. Foram pesados 2g de amostra e adicionados 2g e adicionados 2mL de álcool para solubilização, após, amostras foram digeridas com HCl para liberar os lipídeos ligados à proteínas e caeboidratos por 40 minutos em banho maria. Então foi adicionado, éter de petróleo, e amostras foram centrifugadas e filtradas, e depois levadas à estufa 100°C até atingirem peso constante, de acordo com o método nº 922.06 (AOAC 2005);

5.5.4 Fibras

A determinação do teor de fibras foi feita utilizando método enzimático gravimétrico, de acordo com o método nº 993.19 (AOAC, 2010) que consiste na digestão das amostras com amilases, proteases e HCl e NaOH em meio rico em etanol por uma hora, seguida por precipitação e filtração das amostras, que após esse processo foram deixadas em estufa à 105 °C, levadas ao dessecador e pesadas em balança analítica até atingir peso constante;

5.5.5 Valor Calórico

O valor calórico dos suplementos de café verde foi calculado Segundo a Resolução – RDC n.º 360 de 23 de dezembro de 2003.

Para o calculo do valor calórico é necessário primeiro calcular a umidade da amostra, e com a massa seca, calcular o resíduo mineral fixo ou cinzas. À partir da massa seca, fazer extração dos lipídeos e calcular a quantidade de lipídeos. Fazer digestão do nitrogênio/proteína e calcular a concentração de proteínas no alimento. A fração glicídica corresponde ao valor faltante que completa o valor da amostra seca, logo os valores de carboidratos são calculados, sendo que cada grama de carboidratos e lipídeos correspondem a 4 calorias e cada grama de gordura corresponde à 9 calorias. Após somar, se dá o valor calórico do alimento.

5.6 MINERAIS

Para digestão e quantificação de minerais nas amostras de alimentos, foram utilizados ensaios acreditados na norma NBR/ISSO 17025:2005 para determinação em amostras alimentícias dos seguintes elementos:

- Sódio
- Potássio
- Magnésio
- Calcio
- Manganês
- Ferro
- Zinco
- Cobre
- Fosforo

As amostras foram mineralizadas por micro-ondas de cavidade de acordo com método adaptado de AOAC 2014 – método 999.10, item 9.1.08

A quantificação dos minerais foi realizada por Espectrometria de emissão óptica com plasma de acordo com AOAC 2014 – Método 990.08, item 9.2.39.

5.7 FITATOS

O fitato é o principal sal ou éster armazenado na forma de ácido fitico, nas sementes de plantas com o propósito de protege-las dos efeitos destrutivos do oxigênio e cálcio, porém ao ingerir o fitato, o mesmo atua como um composto antinutricional, visto que tem potencial de quelar cátions di e tri valentes como

Magnésio, Cálcio, ferro, zinco e cobre. Minerais essenciais que atuam em diversas funções biológicas (SILVA; SILVA, 1999). A determinação foi realizada no laboratório de físico-química na Embrapa Agroindústria de alimentos por Plasma de acordo com o método nº 986.11 (AOAC, 2010) modificado da seguinte forma: 2g da amostra foram pesados e adicionado HCl e levados à shaker por 3 horas para serem filtrados à vácuo, e alíquotas foram retiradas e passadas por uma coluna preenchida com resina para posterior análise em espectrofotômetro à 640nm.

5.8 TANINOS TOTAIS

Os taninos são polifenóis solúveis em água presente nos vegetais, como chá e café e sua ingestão está relacionada com efeitos antinutricionais, já que os mesmos formam complexos com proteínas, amido e enzimas digestivas, além de prejudicar a absorção de ferro, causando uma redução no valor nutricional de alimentos. No entanto, os aspectos negativos da ingestão de taninos só podem ser observados quando ingeridos em grandes concentrações. A maioria dos relatos sobre taninos se referem aos efeitos antinutricionais de taninos e estão centrados em ácido tânico e outros taninos hidrolisáveis. Entretanto, os taninos hidrolisáveis estão presentes apenas em elementos traços nos alimentos e os efeitos antinutricionais de taninos estão relacionados aos taninos condensados (CHUNG et al., 1998).

Foi determinado de acordo com metodologia descrita por Deshpande & Cheryan (1987) no laboratório de fisiologia da pós-colheita na Embrapa Agroindústria de Alimentos com base na reação da amostra com uma solução de vanilina 4% em de solução 10% de HCl em metanol;

- A extração dos taninos foi realizada de acordo com metodologia descritas nos itens 5.2 e 5.3, seguida por extração com solução de metanol contendo 10% de HCl por 8 horas em geladeira
- Para a reação foi adicionado em tubos de ensaio, 1mL de amostra mais 5mL de solução de vanilina e posto em repouso por 20 minutos.
- Para cada amostra, foi elaborado um branco, onde foi adicionado 1 mL de amostra com 5mL de solução de metanol e HCl, para que não ocorresse reação com vanilina
- Amostras foram levadas à espectrofotômetro e lidas a 500 nm após 20 minutos de reação.

Para a curva padrão, foi preparada uma amostra de catequina 0,1% em solução de metanol 80% em água e diluídas em concentrações de 0,6 à 2,4 mg/L de taninos condensados para que fosse possível calcular a concentração de taninos nos ECV.

5.9 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO

A atividade antioxidante do café verde está relacionada à presença de polifenóis (principalmente o ácido clorogênico), que reduzem o estresse oxidativo no organismo humano. Os polifenóis podem ser divididos em flavonoides e ácidos fenólicos, sendo o segundo o mais abundante no café verde, representados principalmente pelos isômeros de ácido cafeoilquínico e ácido cafeico (BUDRYN et al., 2013; NAIDU et al., 2008)(BUDRYN et al., 2013; MADHAVA NAIDU et al., 2008)(BUDRYN et al., 2013; MADHAVA NAIDU et al., 2008).

5.10.1 ORAC

A determinação de atividade antioxidante pelo método do ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*) descrita por Zulueta; Esteve; Frígola, (2009) foi realizada no laboratório de fisiologia da pós-colheita na Embrapa Agroindústria de Alimentos, e consiste na transferência de hidrogênio do material antioxidante (amostras ou trolox) para o radical AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)], evitando o ataque à fluoresceína presente no meio. Desta forma, a atividade antioxidante se dá pelo potencial da amostra de proteção à fluoresceína contra o ataque do radical por determinado tempo. A oxidação da fluoresceína foi observada em espectrofluorímetro em microplaca preta de 96 poços (Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol) tendo como referência uma solução de fluoresceína 78nM.

A análise foi realizada da seguinte forma:

- Extração dos compostos bioativos e antioxidantes das amostras de acordo com o item 4.3, seguida por diluição em tampão fosfato de sódio 75mM pH 7,4, para que concentração das amostras fosse equivalente entre 20 e 100 µM de Trolox
- Preparo de solução de fluoresceína 78nM e preparo de radical AAPH 221mM em solução tampão fosfato de sódio 75mM pH 7,4
- Preparo de solução padrão antioxidante (trolox) 10; 20; 40; 60, 80, 100 e 120 µM em tampão fosfato de sódio 75mM pH 7,4
- Foram transferidos para microplaca de 96 poços 80 µL dos pontos da curva de calibração em triplicata, bem como a mesma quantidade das amostras além do branco da reação, onde foi aplicado 80 µL de tampão fosfato.
- Placa foi levada ao espectro fluorímetro da marca Tecan modelo Infinite 200 à 37°C programado com comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 535 nm.
- Aparelho dispensou 80µL da solução de fluoresceína e realizou leitura de absorbância
- Após leitura inicial, aparelho dispensou 40µL da solução de radical AAPH e realizou leitura da absorbância de todos os poços a cada 5 minutos durante 90 ciclos.

A área abaixo da curva (AUC) foi calculada através de software (Prism), utilizando a leitura de fluorescência ao longo dos 90 ciclos da análise. Os valores de AUC de trolox foram subtraídos da AUC do branco e as diferenças utilizadas para a construção da curva de calibração do Trolox. Os coeficientes, linear e angular, obtidos na curva de calibração foram empregados na quantificação das amostras.

Calculo de atividade Antioxidante:

$$ORAC (\mu mol Trolox . g^{-1}) = \frac{[(AUC amostra - AUC branco) - b]}{\frac{a}{CA}}$$

Sendo:

AUC amostra = Area embaixo da curva amostra

AUC branco = Area embaixo da curva branco

b = Coeficiente linear

a = Coeficiente Angular

CA = Concentração da amostra em solução dada em mg.L⁻¹.

5.10 CAFEÍNA

A análise de cafeína é um importante marcador no que se refere a autenticidade dos produtos. Aliado às análises moleculares executadas nesse trabalho, a cafeína é um composto específico de café, de acordo com metodologia de Rosa (2016), e foi analisado no laboratório de cromatografia líquida na Embrapa Agroindústria de alimentos por CLAE aliance 2695 com detetor de arranjo de fotodiodos (PDA) 2996, com 280nm de comprimento de onda e software Empower® (Waters, Massachusetts, EUA). A coluna cromatográfica foi uma BDS Hypersil C18 (5cm x 4,6mm e 3µm – Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) e fase móvel foi composta de 10 de acetonitrila: 90 de solução de ácido acético 0,5%.

A extração dos compostos bioativos das amostras seguiu protocolo escrito nos itens 5.2 e 5.3 e a diluição das amostras foi realizada com a mesma solução da fase móvel e microfiltradas em unidades filtrantes descartáveis de Teflon hidrofílico com porosidade de 0,22µm. Após, cerca de 20 µL das amostras foram injetadas no aparelho de CLAE previamente calibrado com solução padrão de cafeína (1mg/mL).

5.11 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

A extração dos compostos bioativos seguiu os protocolos listados nos itens 5.2 e 5.3 com diluição em solução de 20% de acetonitrila em água, seguida por microfiltração em unidades filtrantes descartáveis de Teflon hidrofílico com porosidade de 0,22µm e a análise de ácidos clorogênicos foi realizada no laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de alimentos, de acordo com metodologia de Rosa (2016) em aparelho de CLAE Alliance 2695, com detetor de arranjo de fotodiodos (PDA) 2996 e software Empower® (Waters, Massachusetts, EUA). Coluna BDS Hypersil C18 (5cm x 4,6mm e 3µm – Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) foi utilizada. A fase móvel foi elaborada em gradiente de concentração da seguinte forma: Composição inicial de 5% de metanol (fase A) e 95% de ácido fórmico 0,5% (fase B) mantida durante 6 minutos. Em 8 minutos a composição da fase móvel atingiu 80% da fase A e assim permaneceu até 10 minutos. Em 11 minutos a composição atingiu o patamar de 100% da fase A e de 12 até 15 minutos a composição retornou às condições iniciais. A vazão da fase móvel foi de 1mL/min com volume de injeção de 3µL em sistema previamente calibrado com padrão externo de ácido clorogênico Sigma-Aldrich (98%) na concentração de 1mg/mL.

5.12 ANÁLISE MICOLÓGICA

A contaminação por fungos produtores de OTA se dá no processamento do café, de acordo com a colheita, secagem e armazenamento do produto (BATISTA et al., 2009).

A análise da microbiota presente nas amostras de café verde foi realizada no laboratório de micologia da Embrapa Agroindústria de alimentos da seguinte forma. Foi pesado 1g de amostra de adicionado cerca de 9mL de água peptonada (0,1%) + tween 80 (0,3%), seguida de diluição seriada, de acordo com metodologia adaptada de Copetti et al., (2009). Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL da suspensão foi plaqueada nos meios de cultura Dicloran-Glicerina (DG18), Batata-Dextrose-agar (BDA) e Dicloran Rose bengal Cloranfenicol (DRBC) e homogeneizadas com auxílio de alça de drigalski. As placas foram incubadas em BOD por um período de 7 dias a 25 °C, e, em seguida, contadas o crescimento de colônias fungos.

A percentagem de contaminação geral será expressa como a percentagem de partículas produzindo crescimento visível de fungos. Os resultados serão expressos em UFC/g (unidades formadoras de colônias).

5.13.1 Identificação dos isolados fungicos

Colônias representativas com o potencial de produzir OTA (gênero *Aspergillus* e seus teleomorfos, especialmente na seção Circumdati e da seção Nigri) foram isoladas em meio de cultura até a obtenção de cultura pura.

Os isolados de *Aspergillus* purificados foram inoculados em três pontos em meio de cultura extrato de malte e agar (MEA) e Czapek extrato de levedura Agar (CYA), antes da identificação com base nas características macroscópicas (crescimento colônia, diâmetro da colônia e microscópicas) usando o esquema de identificação de Pitt; Hocking (1997); Raper; Fennell (1965) e Samson et al., (2014).

5.13 OCRATOXINA A

Metodologia Analítica para Determinação de Ocratoxina A por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em café verde, milho e feijão. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 9 de 24 de março de 2000. *Diário Oficial da União*, Brasília, n.62, 30 de março de 2000. Seção I, p.37.

A análise foi realizada no laboratório de resíduos e contaminantes da Embrapa Agroindústria de alimentos e se baseia na extração da ocratoxina com solução de metanol:bicarbonato de sódio 3% v/v e purificação do extrato em coluna de imunoafinidade, detecção e quantificação de Ocratoxina A por CLAE com detector de fluorescência.

Etapas de extração da Ocratoxina:

5 mL das amostras foram adicionadas a 5mL solução de bicarbonato de sódio 3% NaHCO₃ com 5 mL de metanol P.A, em seguida, Homogeneizado em Omni Mixer® por 5 minutos a 800 rpm.

Amostras foram filtradas à vácuo em papel de filtro de filtração rápida e depois em outras duas diferentes membranas: de fibra de vidro GF/B 1µm e de teflon 0,45 µm.

Foi retirada uma alíquota de 4,0 mL do filtrado e transferido para um erlenmeyer de 250 mL, seguido de adição de 96 mL de solução tampão fosfato e homogeneizado manualmente.

Etapas de purificação de Ocratoxina A:

Uma seringa foi adaptada à uma coluna de imunoafinidade, utilizando um adaptador e conectada ao Suporte Supelco®.

O conteúdo do erlenmeyer foi transferido quantitativamente para a coluna, deixando passar com fluxo de 2 a 3 mL/ min.

Coluna foi lavada com 10 mL de água ultrapura, sendo 5mL no erlenmeyer e outros 5 mL na seringa, deixando a coluna secar.

4mL de metanol grau HPLC foi transferido para a seringa, aguardando que este preenchesse a coluna e mantendo o metanol em contato com a coluna por 3 minutos.

Solução de Ocratoxina A foi eluída para um frasco âmbar de 8 mL com o fluxo de 2 a 3 mL/min.

Eluato foi evaporado até a completa secura, sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 40°C e ressuscitado em 350 µL de fase móvel.

A detecção foi realizada em aparelho de CLAE com detetor de fluorescência em coluna X Terra® RP18, 5µm, 4,6x250mm com fase móvel de água, acetonitrila, metanol e ácido acético com volume de injeção de 20 µL.

Calculos:

$$\text{Quantidade de Ocratoxina A } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right) = \frac{Ca \times V1 \times V3}{m \times V2}$$

Ca = concentração da amostra obtida através da curva de calibração (µg/L).

V1 = volume de extração da amostra (0,2 L).

V2 = Volume do filtrado adicionado à coluna de imunoafinidade (4mL).

V3 = Volume de retomada do extrato purificado (0,35mL).

m = massa da amostra em kg.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PRODUÇÃO DO ECV

Aproximadamente 2 litros do ECV foram levados ao equipamento de *spray dryer* para atomização e transformação do extrato em pó solúvel, obtendo um rendimento de 150 g de pó solúvel, o qual foi utilizado nas demais análises do trabalho.

6.2 AUTENTICIDADE DOS PRODUTOS COMERCIAIS

Diversos produtos de fonte alimentícia estão disponíveis no mercado e a técnica de PCR tempo real, utilizando *primers* específicos para determinado analito já é estabelecida (ARLORIO et al., 2007; COSTA; MAFRA; OLIVEIRA, 2012; FERREIRA et al., 2016). Dessa forma é possível identificar o DNA com alta especificidade, mesmo em amostras ultraprocessadas. Esta técnica também vem sendo utilizada para análise da autenticidade de suplementos alimentares (LEE et al., 2016; MARSLIN et al., 2017), mas até o momento não foi relatado na literatura a verificação da autenticidade de suplementos alimentares à base de café verde.

Após extração de DNA das amostras de suplementos alimentares, foi realizada a eletroforese para identificação da autenticidade dos produtos. Utilizou-se o par de primers *cafe1* desenvolvido no laboratório de diagnóstico molecular, na Embrapa Agroindústria de alimentos. O primer se mostrou específico, já que apenas um fragmento de 100 pares de base mostrou amplificação, conforme Figura 6.



Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose

Amostras foram aplicadas em triplicata nos poços contendo controles negativo e positivo. As amostras que mostraram amplificação foram: 2, 4, 6 e 8. As demais amostras, foram submetidas à análise de PCR tempo real utilizando o sistema SYBR Green. A Figura 7 mostra a curva de amplificação das amostras, junto com o controle positivo, evidenciando a existência de DNA de café nas amostras 9 e 3.

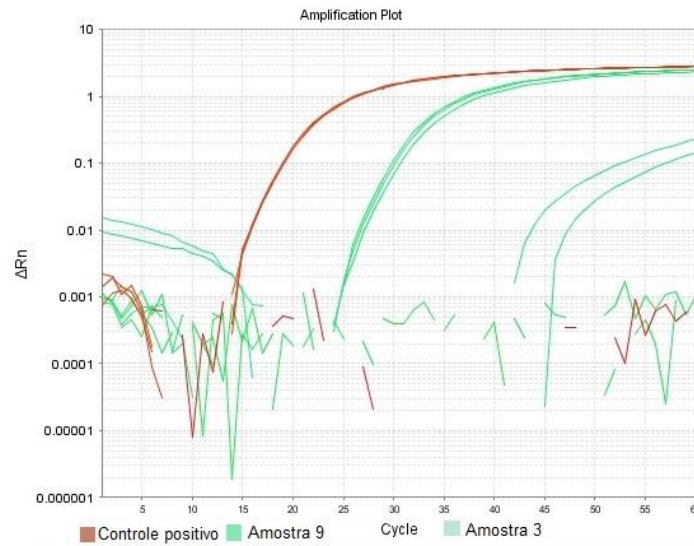


Figura 7 - Curva de amplificação das amostras 3 e 9 e Controle positivo

As demais amostras (1, 5 e 7) que não amplificaram utilizando o par de *primers* iniciadores foram observadas que a temperatura de melting foi diferente do controle positivo, em torno de 78°C, não sendo possível identificar a presença de DNA de café nestas amostras, como mostra a Figura 8.

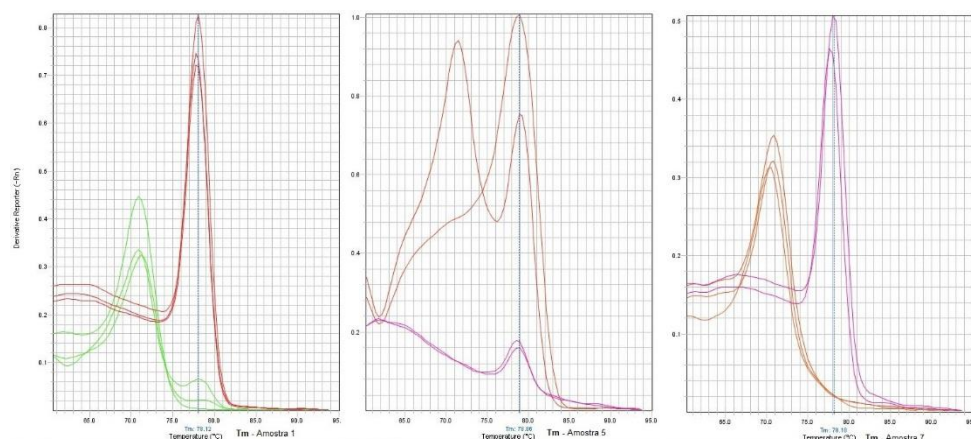


Figura 8 - Curva de temperatura de *melting* das amostras 1, 5 e 7, respectivamente.

Os baixos rendimentos de extração de DNA podem ser explicados pelo processo de produção dos suplementos alimentares, visto que podem degradar o

DNA no processamento, além da presença de polifenóis e polissacarídeos que podem inibir a ação da enzima Taq Polimerase, tornando a análise de PCR não viável (MANZANO et al., 2003). De 9 amostras analisadas nesse estudo, foi possível a identificação de DNA de café em 6 amostras, o que mostra que a técnica é viável para suplementos alimentares à base de café verde, no entanto, os métodos de processamento das amostras 1, 5 e 7 podem tornar a análise de PCR inviável. Outras análises como a concentração de ácidos clorogênicos e cafeína também foram utilizadas como análises acessórias na identificação da autenticidade destes produtos.

6.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL PARA ROTULAGEM

Afim de comparar a composição centesimal dos produtos com a informações contidas nos rótulos dos produtos comerciais e realizar a caracterização físico química do produto elaborado neste trabalho para rotulagem (amostra 10), foram realizadas as análises que se encontram na Tabela 8.

Tabela 8 - Composição centesimal dos suplementos alimentares de café verde

Composição Centesimal (g/100g)	Amostras									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Umidade	1,41	9,37	8,42	NQ	8	6,13	7,42	10,24	5,67	4,48
Cinzas	16,22	0,35	0,46	1,62	1,97	3,54	13,35	3,05	20,6	3,71
Nitrogênio Total	1,28	0,54	0,1	0,37	0,05	0,15	1,95	1,59	0,35	2,03
Proteína	7,36	3,11	0,58	2,13	0,29	0,86	11,21	9,14	2,1	11,67
Extrato Etéreo	61,43	0,68	0,12	81,18	0,09	0,45	0,5	2,52	2,88	0,71
Fibra alimentar	NQ	2,29	NQ	NQ	NQ	68,23	10,8	20,13	39,09	3,49
Carboidrato	13,58	84,21	90,43	15,07	89,65	20,79	57,44	54,92	29,75	75,94
Valor calórico	626,36	355,36	365,08	799,42	360,57	90,65	279,1	278,92	152,96	67,04

O produto elaborado neste trabalho (amostra 10) foi o produto que apresentou o menor valor calórico (67,04kcal/100g) quando comparado aos produtos comerciais que apresentaram valor calórico variando entre 90,65 a 799,42 kcal/100g.

Amostra 1 apresenta no seu rótulo valor calórico de 551 kcal e resultados obtidos foram de 626 kcal/100g. Os valores de extrato etéreo batem com os valores apresentados no rótulo do produto.

Os valores de composição para rotulagem da amostra 2 ficaram bem próximos dos valores exibidos no rótulo do produto.

No rótulo da amostra 3 consta que o produto não com valores significativos de carboidratos, gorduras e proteínas, o que diverge dos valores obtidos em análise, principalmente no que se refere ao valor calórico que no rótulo do produto não consta, foi obtido resultado de 365,08kcal/100g.

O valor calórico informado no rótulo da amostra 4 é menor que a metade (312,5kcal) que o resultado obtido por esse trabalho.

Amostra 5 informa no rótulo que a quantidade de carboidratos é de 1 g / 2 g, diferente dos resultados encontrados, onde são 1,79 g / 2 g quando feita a conversão.

Em seu rótulo, amostra 6 não relata que não há resultados significativos de carboidratos e fibra alimentar, resultados divergentes dos encontrados nessa análise, 20,79 e 68,23, respectivamente. Também consta no rótulo do produto que

não há valores significativos de valor calórico, diferente do resultado de 90,65 kcal;100 g encontrados.

Amostra 7, em seu rótulo, informa que não contém quantidades significativas de carboidratos, fibra alimentar, gorduras e valor calórico, diferente do que foi encontrado nesta análise, onde os dados se encontram na Tabela.

Amostra 8 apresentou valor calórico rotulado maior (415 kcal) que resultados de análise de composição centesimal.

Amostra 9, produto comprado nos Estados Unidos da América, em virtude da legislação do país, não especifica valores de calorimetria e composição centesimal em seu rótulo.

Silva; Ascheri; Pereira (2007) determinaram a composição centesimal em amostras de pó de café torrado e moído e seus resultados estão expressos na Tabela 9, valores divergentes aos resultados referente aos suplementos alimentares comerciais de café verde e ao produto elaborado neste trabalho, o que pode ser explicado pelo processo de produção dos suplementos alimentares e do grão não estar *in natura*.

Tabela 9 - Composição centesimal de pó de café torrado e moído

Composição em (g/100g)	pó de café
Umidade	4,89
Lipídeos	11,6
Proteína	15,75
Carboidratos totais	62,92
Cinzas	4,84
Fibras totais	14,22
Valor calórico	419,08

Fonte: Adaptado de Silva; Ascheri; Pereira (2007).

Lago; Antoniassi; Freitas (2001) ao estudarem a composição centesimal de amostras de café brasileiros, obtiveram resultados expressos na Tabela 10. Pode-se notar que os valores de carboidratos, lipídeos e proteína são menores nos suplementos alimentares de café verde. Os produtos com concentrações mais altas de lipídeos utilizam óleo na sua formulação. Vale considerar também que durante o processamento para obtenção do suplemento alimentar, pode degradar os compostos mencionados.

Tabela 10 - Composição centesimal em amostra de café verde

Composição em (g/100g)	Café verde
Umidade	11,79
Lipídeos	5,69
Proteína	14,48
Carboidratos totais	64,08
Cinzas	3,96
Fibras totais	18,19

Fonte: Adaptado de Lago; Antoniassi; Freitas (2001)

6.4 COMPOSIÇÃO MINERAL

O valor referente à composição mineral dos suplementos alimentares de café verde se mostrou muito variada (Tabela 11), o que pode ser explicado pela variedade de formulação dos produtos, além disso, alguns produtos como as amostras 6, 7 e 9 adicionam alguns minerais, como especificado no rótulo dos produtos.

Tabela 11 - Composição mineral de suplementos alimentares de café verde

Amostra	Minerais (mg/kg)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sódio	655,92	299,69	528,03	276,06	334,16	404,03	355,64	94,33	1037,01	264,67
Potássio	1125,47	445,46	1130,72	7294,02	526,72	NQ	4244,84	6868,98	5905,59	21678,75
Magnésio	1310,68	161,97	108,08	747,66	148,52	662,24	27633,86	2059,52	641,78	1943,27
Calcio	411,17	89,64	85,26	370,13	121,12	30,43	1851,71	563,88	54857,02	565,91
Manganês	9,42	1,52	3,66	1,91	NQ	NQ	333,53	87,30	2,49	22,09
Ferro	67,84	7,26	4,57	12,78	11,44	11,23	104,43	66,62	10,95	36,38
Zinco	12,95	ND	ND	ND	ND	ND	4,05	59,88	ND	5,35
Cobre	4,80	ND	ND	ND	ND	ND	NQ	5,49	ND	8,06
Fósforo	2117,84	166,41	157,60	415,12	97,92	21,69	555,67	5437,70	33527,77	2230,02
Cromo	ND	ND	ND	12,01	ND	6,38	5,83	ND	ND	ND
Alumínio	11,33	ND	3,34	ND	7,05	14,25	353,94	9,30	4,63	ND
Cádmio	NQ	NQ	ND	NQ	ND	ND	NQ	NQ	ND	ND
Cobalto	NQ	NQ	ND	NQ	ND	ND	NQ	NQ	ND	ND
Chumbo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,30	ND	ND	ND

A amostra 6 especifica que 1,6g do suplemento alimentar contém 10,5 µg de Cromo, logo, em 1kg do produto é encontrado 6,56 mg do mineral, logo esses resultados são próximos dos encontrados.

A amostra 7 especifica que em 1,32g do produto contém 35 µg de Cromo, logo, em 1kg do produto é encontrado 26,52 mg do mineral. Esses dados divergem com os encontrados na análise, de 5,83 mg. A amostra também mostrou uma leve contaminação por chumbo, no entanto, ao tomar 2 cápsulas ao dia do produto, tendo como referência 1,2g de consumo diário

sugerido pelo fabricante, a ingestão será de 0,36 µg de chumbo ao dia. O limite máximo estabelecido pela união europeia de ingestão de metal pesado é de 25 µg por dia.

A Amostra 8 informa no rótulo 260 mg/kg de sódio, no entanto, foi quantificado 94,33mg/kg.

As amostras 1;2;3;4;5 e 7 no rótulo informam que não há quantidades significativas de sódio, diferente dos resultados obtidos nesse trabalho.

Os resultados da literatura também demonstram uma amplitude muito grande da variação da concentração de minerais em amostras de café verde, como relata Morgano et al., (2002) com resultados representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Composição mineral em amostras de café cru

Minerais	[mg/kg]
Aluminio	0,612 - 32,2
Cálcio	925 - 1889
Cobalto	0 - 1,16
Cobre	6,21 - 369
Ferro	23,3 - 367
Potássio	12252 - 17205
Magnésio	1526 -2059
Manganês	14,2 - 60,4
Fósforo	1172 - 1826
Zinco	3,71 - 57

Fonte: Adaptado de Morgano et al. (2002)

Şemen et al., (2017)também relatou variedade de composição mineral em amostras de café verde, como mostra a Tabela 13.

Tabela 13 - Composição mineral em amostras de café verde

Minerais	[mg/kg]
Aluminio	4,56 - 45,28
Cálcio	400,91 - 733,99
Cobalto	0,09 - 0,25
Cobre	9,85 - 14,74
Potássio	5505,28 - 9068,07
Magnésio	1181,87 - 1669,76
Manganês	3,69 - 19,53
Fósforo	182,26 - 1288,6
Zinco	3,79 - 42,36

Fonte: Adaptado de Şemen et al., (2017).

6.5 FITATO

As concentrações de fitatos nas amostras de café verde estão representadas na Tabela 14. Amostra 8, apresentou maior nível de fitato, o que pode ser explicado pela composição do produto que além de café contém chia e linhaça, cereais que podem ser fontes de fitato (SILVA & SILVA, 1999). Já, os demais suplementos alimentares, não possuem cereais em sua formulação, o que pode explicar a baixa ou ausência da concentração de fitatos.

Tabela 14 - Concentração de fitatos nas amostras de suplementos alimentares de café verde

Fitato	
Amostra	mg/g
1	3,63
2	NQ
3	NQ
4	NQ
5	NQ
6	NQ
7	NQ
8	15,95
9	0,76
10	4,56

6.6 TANINOS

As amostras de suplementos de café verde comercial não obtiveram resultados com concentrações de taninos quantificáveis, já a amostra elaborada por esse trabalho apresentou resultados de 0,57 mg.100g de taninos condensados. Provavelmente o processamento para obtenção dos ECV degradou os polifenóis de taninos.

(Lima et al., (2012) reportaram em chás verde e preto com concentrações em torno de 41-64 mg/L. Hečimović et al., (2011) reportaram valores de 7,36mg/g à 12,49mg/g de taninos em amostras de café robusta verde.

6.7 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados de atividade antioxidante determinada pela metodologia de ORAC. variaram entre 33,02 μmol de trolox/g até 2408,05 μmol de trolox/g, o que mostra que a heterogeneidade dos produtos (Figura 9). A faixa de variação da atividade antioxidante dos suplementos alimentares de café verde, provavelmente, se dá pela variação da formulação dos produtos que contém outras fontes de compostos que exercem função antioxidante (COSTA et al., 2012). O suplemento de ECV elaborado nesse trabalho (amostra 10) mostrou um excelente potencial antioxidante, quando comparado aos produtos comerciais de café verde.

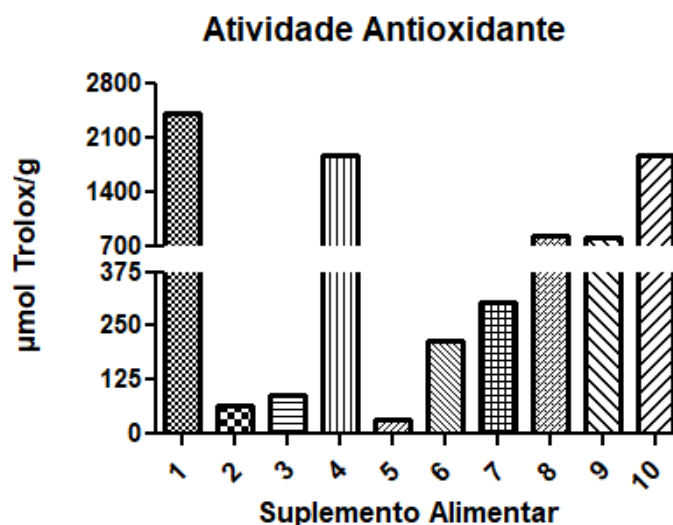


Figura 9 - Atividade antioxidante de suplementos alimentares de café verde

Liang et al., (2016) analisaram a atividade antioxidante de grãos de café arábica verde provenientes da Republica Dominicana, Peru, Sumatra, Papua Nova Guiné e Etiópia e obtiveram valores de 410; 450; 420; 380 410 μg trolox equivalente/grama.

Amigoni et al., (2017) analisou o extrato de café verde obtido através de extração em ultrassom utilizando água e metanol como solvente e obtiveram resultados de 3291,7 μg trolox equivalente/grama.

O processo de obtenção dos suplementos alimentares de café verde pode ser o diferencial no que se refere a extração dos compostos bioativos, além da formulação e escolha da matéria prima, já que é sabido que os grãos de café robusta contém mais ácidos clorogênicos, que desempenham um importante fator na atividade antioxidante de um produto (HENDRE; AGGARWAL, 2014).

6.8 CAFEÍNA

Os resultados de cafeína dos suplementos alimentares de café verde, variaram em níveis de 0,18 a 20 mg/g e estão representados na Figura 10.

A amostra 2 não apresentou grande potencial antioxidante, nem altos níveis de ácidos clorogênicos porém apresentou a segunda maior concentração de cafeína, o que pode gerar uma hipótese de adição do composto isolado, já que a cafeína é um importante marcador de café e a mesma pode atuar na regulação do peso corpóreo pelo seu efeito termogênico.

A amostra 1 apresentou altos níveis de cafeína, porém não foi identificado DNA de café na mesma, mas esse fato pode ser justificado pela presença de cacau, que também contém cafeína. Além da amostra 1, a amostra 3 contém chá verde e a amostra 8 contém laranja, que são fontes de cafeína conforme relata Gaascht; Dicato; Diederich (2015).

O suplemento alimentar (amostra 10) elaborado nesse trabalho apresentou os maiores níveis de cafeína em relação às amostras comerciais.

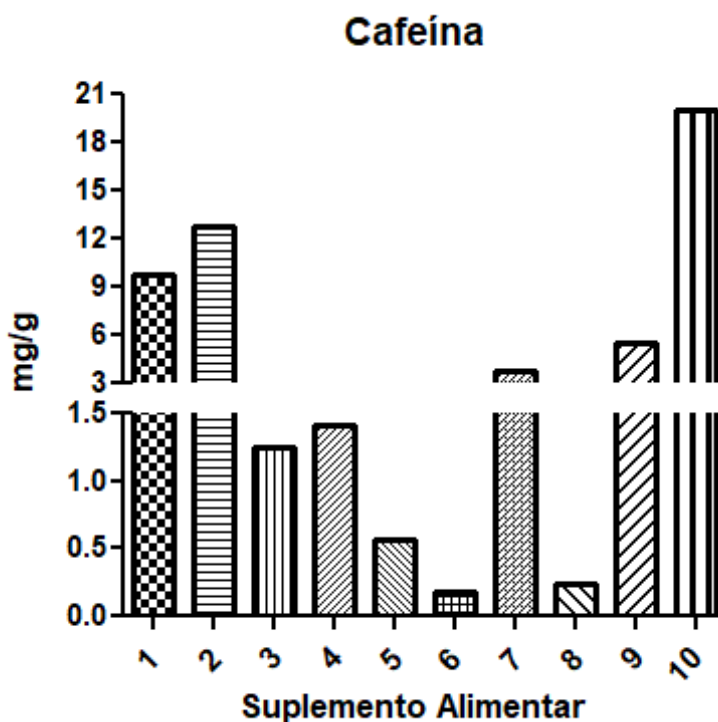


Figura 10 - Concentração de cafeína em amostras de suplemento alimentar de café verde.

Jeszka-skowron; Stanis; de Peña (2016) relata concentrações de cafeína em 7 amostras de café robusta verde com concentrações que variam entre 68 – 80 mg/g, o que evidencia que o processamento para obtenção de produtos de café possa degradar a cafeína e diminuir sua concentração no produto final.

(BELGUIDOUM et al., 2014) relataram níveis de cafeína em amostras de café robusta verde que variou entre 0,25 – 27,2 mg/g, valores próximos aos suplementos alimentares de café verde.

6.9 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

Os dados são mostrados somente em função do principal isômero que é o ácido 5-cafeoilquínico (5CQA). Os resultados variaram numa faixa de 0,50 – 48,8 mg/g (Figura 11).

O produto elaborado nesse trabalho (amostra 10) foi o que apresentou maiores concentrações de ácido 5CQA (48,8 mg/g).

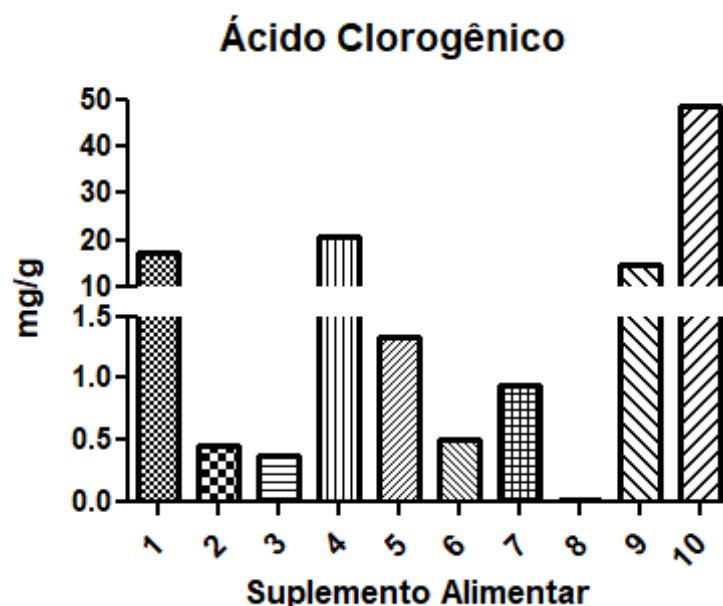


Figura 11 - Concentração de ácido clorogênico em amostras de suplemento alimentar de café verde.

Dziki et al., (2015) analisaram o perfil de ácidos clorogênicos (5cqa) de 4 amostras de café arábica e obteve resultados de 27,64 - 39,92 mg/g, o que corrobora os níveis de ácido clorogênico em algumas das amostras analisadas nesse trabalho.

Jeszka-skowron et al. (2016) analisaram os níveis de ácido clorogênico em 7 amostras de café robusta verde com concentrações que variam entre 56 – 144 mg/g, o que deixa em evidência que os níveis de ácidos clorogênicos é maior em grãos de café robusta quando comparados a grãos de café arábica e que o consumo dos grãos de café verde *in natura* pode influenciar e contribuir mais para o consumo de fenólicos do que suplementos alimentares à base de café verde.

6.10 DIVERSIDADE FUNGICA

Após semeadura para crescimento dos fungos filamentosos, foi observada uma baixa diversidade fungica em todas as amostras analisadas, mesmo utilizando meios de cultura com baixa atividade de água. A Tabela 15 apresenta a quantificação de colônias obtidas.

Tabela 15 - Diversidade micologica das amostras

Amostra	Nº Colônias
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	4
8	10
9	0
10	0

Só foi observado crescimento fúngico nas amostras 7 e 8 e as colônias representativas foram isoladas em meios MEA e CYA para posterior identificação.

A pouca diversidade fungica pode ser atribuída pelo grau de processamento e possível boas práticas de fabricação utilizada na preparação dos suplementos alimentares e produção do café verde. Os níveis drásticos de processamento da matéria prima reduziu aa diversidade micologica dos produtos..

Também foram observados crescimento de leveduras e bactérias nas amostras 2 e 5.

6.11 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FUNGICOS

Após crescimento fungico, colônias foram isoladas para em meio de cultura específico para fungos (MEA e CYA).

Foram identificados os fungos potencialmente produtores de micotoxinas da seção Nigri e Circumdati com base nas características macroscópicas dos suplementos alimentares 7 e 9, como mostram as Figuras 12 e 13.



Figura 12 - Crescimento de fungos das seções Nigri e Circumdati, respectivamente, no produto comercial 7

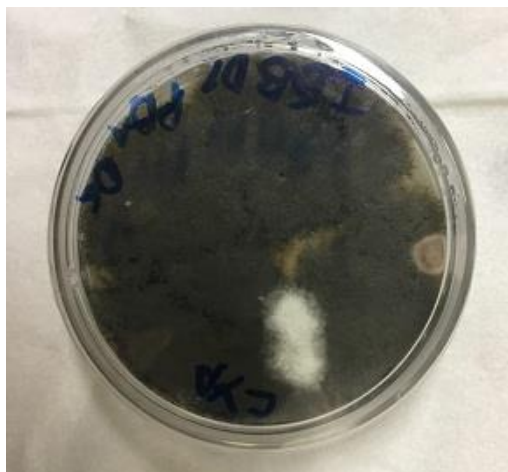


Figura 13 - Crescimento de Black Aspergillus da seção Nigri no produto comercial 8.

6.12 OCRATOXINA A

Dos dez produtos analisados nesse trabalho, 6 apresentaram resultado positivo para contaminação com OTA (Tabela 16), porém, nenhum resultado foi acima do limite da legislação para café torrado, já que ainda não existe um limite máximo estabelecido para o consumo de micotoxinas em café verde.

Apesar de as amostras 5 e 7 apresentarem crescimento de fungos potencialmente produtores de micotoxinas, as mesmas não apresentaram níveis quantificáveis de OTA, o que pode ser explicado por esses fungos já fazerem parte da microbiota presente nos processos produtivos de alimentos, porém não produziram metabólitos secundários (WONTNER-SMITH et al., 2014).

Vaclavik et al. (2013) analisaram os níveis de OTA em 50 amostras de suplementos alimentares contendo ECV e constataram uma incidência de OTA em 36% das amostras com níveis que variaram entre 2,7 – 136,9 µg/kg. A incidência de OTA nos suplementos alimentares analisados nesse trabalho foi de 60% porém os níveis de contaminação por essa micotoxina foram muito menores (0,26-4,8 µg/kg).

A contaminação em café de varrição é ainda maior, segundo relatam Moraes; Luchese, (2003) que analisou os níveis de OTA em café verde do estado do Rio de Janeiro, apresentando níveis de 0,3 à 160 µg/kg e da região nordeste do estado que apresentou níveis de 10,1 à 592 µg/kg. Campos et. Al, (2008) analisaram os níveis de OTA em café brasileiro de permanência prolongada na planta e no solo. Apesar de amostras de café com permanência prolongada na planta apresentarem colonização por *Aspergillus ochraceus*, não foi possível quantificar OTA nas amostras, ao contrário das amostras de café de varrição que apresentaram níveis de atividade de água maior e níveis de OTA entre 30,93 e 49,42 µg.kg-1.

O processo de torrefação de café pode ocasionar a degradação da OTA pela alta temperatura empregada no processo (ICO, 2006).

Dado ao consumo tradicional do café com elaboração de uma bebida do grão torrado e moído, a legislação brasileira através da RDC nº 07 de 2011, estabelece o limite máximo de 10 µg/kg de OTA, não existindo limite para os produtos à base de café verde, como os suplementos alimentares analisados nesse trabalho. No entanto, os malefícios associados à ingestão de OTA podem ser sentidos por quem consome tais produtos.

Tabela 16 - concentração de OTA em amostras de suplementos alimentares de café verde.

Produto	[OTA] (µg/kg)
1	1,58
2	4,80
3	0,61
4	0,26
5	0
6	0
7	0
8	0
9	3,19
10	0,26

O cromatograma (Figura 14) mostra o cromatograma referente à ocratoxina da amostra 2, que apresentou o maior nível de contaminação (4,80 µg/kg) em relação ao tempo de retenção dos pontos da curva padrão, exemplificando o ponto 7 (Figura 15).

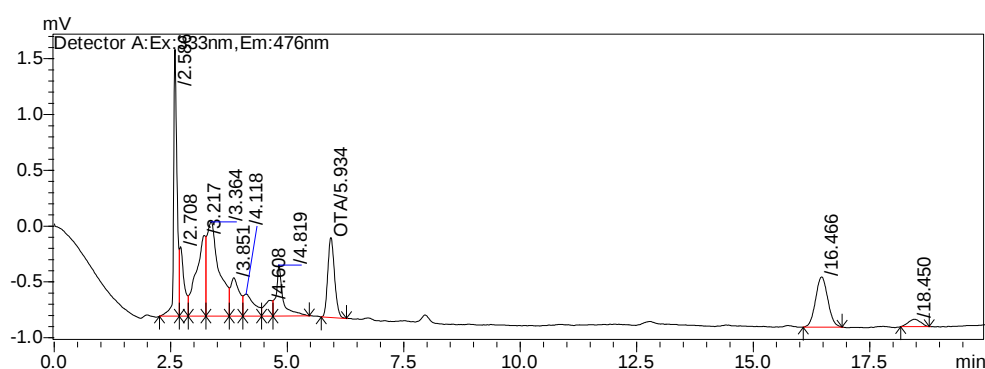


Figura 14 - Cromatograma evidenciando contaminação por OTA na amostra 2.

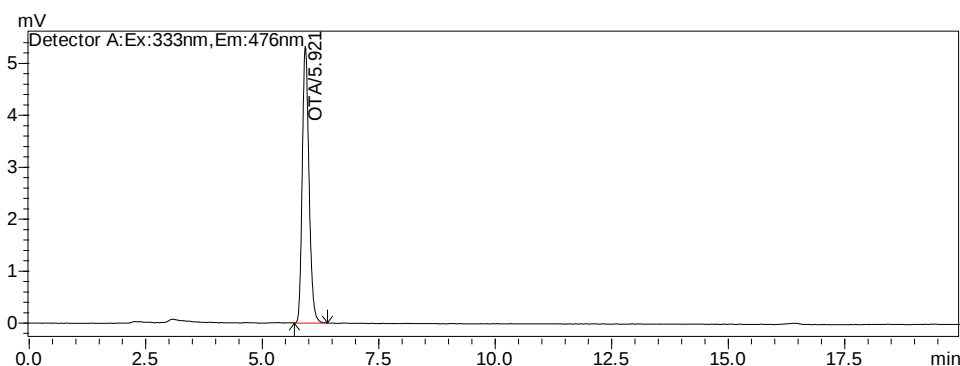


Figura 15 - Cromatograma com Ponto 7 da curva padrão de OTA.

7. CONCLUSÕES

Foi elaborado um produto de ECV, que foi utilizado como padrão para todas as análises deste trabalho. A partir de 2 litros de ECV, que foi submetido a procedimento de atomização para transformação em pó solúvel, com rendimento de 150g.

A avaliação da autenticidade dos suplementos alimentares à base de café verde por métodos moleculares permitiu a identificação de DNA de café através da utilização de Primers específicos para DNA de café.

Para identificação de DNA de café, foram realizadas análises de PCR, seguidas por eletroforese em gel de agarose, onde foi possível identificar DNA de café em 4 das amostras de suplementos alimentares comerciais (2, 4, 6 e 8). Por não ser possível a visualização de DNA no gel de agarose, as demais amostras foram submetidas à análise de PCR em tempo real, por ser um método de análise mais sensível, onde foi possível identificar DNA de café nas amostras 3 e 9. Não foi identificado DNA de café nas amostras 1, 5 e 7.

A partir da análise de composição centesimal, foi possível comparar os resultados obtidos com as informações contidas nos rótulos dos produtos, além de produzir informações para rotulagem do produto obtido neste trabalho (amostra 10). Foram encontradas divergências nas informações dos rótulos de todos os suplementos alimentares, exceto pela amostra 2. A amostra 9 não continha nenhuma informação sobre valor calórico no rótulo. A amostra formulada neste trabalho apresentou o menor valor calórico, o que pode ser uma vantagem, no que se refere a um suplemento alimentar com proposta para controle de peso.

A composição mineral dos suplementos alimentares se mostrou muito variada, pois alguns dos produtos adicionam alguns minerais em sua formulação. Foi possível identificar cádmio na amostra 7 e concentrações de sódio diferentes das informadas no rótulo para as amostras 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 e amostra 9 não especifica quantidades de sódio no rótulo.

As amostras 1; 8; 9 e 10 apresentaram níveis de fitato. Os maiores níveis de fitato observados na amostra 8, pode ser explicado por sua formulação.

Apenas a amostra formulada nesse trabalho apresentou uma baixa concentração de taninos condensados.

Houve uma grande variação nos valores de atividade antioxidante das amostras, tendo alguns suplementos alimentares apresentando valores baixos, sendo que o potencial antioxidante destes produtos é um importante fator para sua comercialização.

A amostra 2 não apresentou bom resultado de atividade antioxidante frente as outras amostras, no entanto, apresentou altos níveis de cafeína. Especula-se que seja adicionada cafeína ao produto.

Foi possível quantificar ácidos clorogênicos em todas as amostras, inclusive nas amostras onde não foi possível identificar DNA de café. As amostras 1; 5 e 7 apresentaram altos níveis de ácido clorogênico, o que pode ser explicado pela adição do composto fenólico na formulação.

Apesar de amostras 7 e 8 apresentarem crescimento de fungos identificados como possíveis produtores de OTA, não foi possível quantificar este metabólito secundário nestas amostras.

Foi possível quantificar OTA em 6 das amostras analisadas neste trabalho, porém não foram identificados fungos produtores de OTA na análise de diversidade micológica dos produtos. O processo de produção dos suplementos alimentares pode levar a destruição da diversidade fungica mas não de metabólitos secundários como a OTA

REFERÊNCIAS

ADRIANA FARAH, *,†,‡ et al. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. 2005.

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.

AMIGONI, L. et al. Green coffee extract enhances oxidative stress resistance and delays aging in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 297–306, 2017.

ARLORIO, M. et al. Detection of hazelnut (*Corylus* spp.) in processed foods using real-time PCR. **Food Control**, v. 18, n. 2, p. 140–148, 2007.

BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 293–300, 2003.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, n. 9, p. 784–790, 2009.

BELGUIDOUM, K. et al. HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 4, p. 1314–1320, 2014.

BUCHANAN, R.; BECKETT, R. D. **Green Coffee for Pharmacological Weight Loss** **Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

BUDRYN, G. et al. Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 149–160, 2013.

BUDRYN, G. et al. Inclusion complexes of β -cyclodextrin with chlorogenic acids (CHAs) from crude and purified aqueous extracts of green Robusta coffee beans (*Coffea canephora* L.). **Food Research International**, v. 61, p. 202–213, 2014a.

BUDRYN, G. et al. Inclusion complexes of β -cyclodextrin with chlorogenic acids (CHAs) from crude and purified aqueous extracts of green Robusta coffee beans (*Coffea canephora* L.). **Food Research International**, v. 61, p. 202–213, 1 jul. 2014b.

CAI, Y. et al. Chlorogenic acid increased acrylamide formation through promotion of HMF formation and 3-aminopropionamide deamination. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 1–5, 2014.

CAMPA, C. et al. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. **Annals of botany**, v. 110, n. 3, p. 595–613, 2012.

CASAL, S. et al. Discrimination between Arabica and Robusta Coffee Species on the Basis of Their Amino Acid Enantiomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6495–6501, 2003.

CHEN, J. F. et al. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. RC143, 15 maio 2001.

CHUNG, K. T. et al. Tannins and human health: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421–464, 1998.

CLARKE, R. J. Grading, Storage, Pre-treatments and Blending. In: **Coffee**.

Dordrecht: Springer Netherlands, 1987. p. 35–58.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S. Food Chemistry The cinnamoyl – amino acid conjugates of green robusta coffee beans. **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 457–463, 2004.

CONNELLY, P. Nutritional advantages and disadvantages of dietary phytates: part 1. n. 8, p. 9–13, 2011.

COPETTI, M. V et al. Comparison of different culture media for mycological evaluation of commercial pet food. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 329–335, 2009.

COSTA, A. S. G. et al. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 324–328, 2012.

COSTA, J.; MAFRA, I.; OLIVEIRA, M. B. P. P. High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 1062–1069, 2012.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, 2009.

DE MEJIA, E. G.; RAMIREZ-MARES, M. V. Impact of caffeine and coffee on our health. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 10, p. 489–492, 2014.

DELLALIBERA, O.; LEMAIRE, B.; LAFAY, S. Svetol® , green coffee extract , induces weight loss and increases the lean to fat mass ratio in volunteers with overweight problem. **Phytoterapy**, v. 4, n. 4, p. 194–197, 2006.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M. Determination of Phenolic Compounds of Dry Beans Using Vanillin, Redox and Precipitation Assays. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 2, p. 332–334, 1 mar. 1987.

DZIKI, D. et al. Ground green coffee beans as a functional food supplement - Preliminary study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 691–699, 2015.

FELDMAN, J. R.; RYDER, W. S.; KUNG, J. T. Importance of Nonvolatile Compounds to the Flavor of Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 733–739, 1969.

FERREIRA, T. et al. Using Real-Time PCR as a tool for monitoring the authenticity of commercial coffees. **Food Chemistry**, 2016.

FLANAGAN, J. et al. Lipolytic activity of svetol??, a decaffeinated green coffee bean extract. **Phytotherapy Research**, 2014.

FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F.; OLIVEIRA, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 7, p. 709–715, 2005.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimetos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

GAASCHT, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer. **Genes and Nutrition**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 2015.

GROSSO, G. et al. Coffee, Caffeine, and Health Outcomes: An Umbrella Review. **Annual Review of Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 131–156, 2017.

GURLEY, B. J.; STEELMAN, S. C.; THOMAS, S. L. Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: History, safety, and efficacy. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 2, p. 275–301, 2015.

HEČIMOVIĆ, I. et al. Comparative study of polyphenols and caffeine in

different coffee varieties affected by the degree of roasting. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 991–1000, 2011.

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROTZOLL, F. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research and Technology**, v. 209, n. 3, p. 297–300, 1999.

HENDRE, P. S.; AGGARWAL, R. K. Development of Genic and Genomic SSR Markers of Robusta Coffee (*Coffea canephora* Pierre Ex A. Froehner). **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e113661, 2 dez. 2014.

HENRY-VITRAC, C. et al. Contribution of chlorogenic acids to the inhibition of human hepatic glucose-6-phosphatase activity in vitro by svetol, a standardized decaffeinated green coffee extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2010.

HERNÁN, M. A. et al. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 52, n. 3, p. 276–284, set. 2002.

HERRMANN, K.; NAGEL, C. W. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 315–347, jan. 1989.

JESZKA-SKOWRON, M.; STANISZ, E.; DE PEÑA, M. P. Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 243–250, 2016.

LEE, J. H. et al. Specific PCR assays to determine bovine, porcine, fish and plant origin of gelatin capsules of dietary supplements. **Food Chemistry**, v. 211, p. 253–259, 2016.

LI KWOK CHEONG, J. D. et al. Green coffee polyphenols do not attenuate features of the metabolic syndrome and improve endothelial function in mice fed a high fat diet. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2014a.

LI KWOK CHEONG, J. D. et al. Green coffee polyphenols do not attenuate features of the metabolic syndrome and improve endothelial function in mice fed a high fat diet. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 46–52, 2014b.

LIANG, N. et al. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 213, p. 251–259, 2016.

LIMA, A. R. et al. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 20–24, 2010.

LIMA, M. B. et al. Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer. **Talanta**, v. 88, p. 717–723, 2012.

LIU, Q. M. et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Folium eucommiae* and evaluation of its antioxidant activity. **Journal Of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 23, p. 2503–2511, 2010.

LUDWIG, I. A. et al. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food & function**, v. 5, n. 8, p. 1695–717, ago. 2014.

MADHAVA NAIDU, M. et al. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. **Food Chemistry**, 2008.

MAHABIR, S. Methodological challenges conducting epidemiological research on nutraceuticals in health and disease. **PharmaNutrition**, 2014.

MANZANO, M. et al. A molecular method to detect *Bacillus cereus* from a coffee concentrate sample used in industrial preparations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 6, p. 1361–1366, 2003.

MARSLIN, G. et al. Assessment of the Authenticity of Herbal Dietary Supplements: Comparison of Chemical and DNA Barcoding Methods. **Planta Medica**, v. 81, n. 12–13, p. 1647–1653, 2017.

MONAKHOVA, Y. B. et al. Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using ¹H NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 182, p. 178–184, 1 set. 2015.

MONTEIRO, M. et al. Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 10, p. 2196–2201, 2007.

MORGANO, M. A. et al. Determinação de minerais em café cru. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 19–23, jan. 2002.

MURASE, T. et al. Coffee polyphenols modulate whole-body substrate oxidation and suppress postprandial hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and hyperlipidaemia. **British Journal of Nutrition**, 2012.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v. 8, n. 19, p. 4321–5, 10 out. 1980.

NARITA, Y.; INOUE, K. High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 943–949, 2012.

NARITA, Y.; INOUE, K. Chlorogenic Acids from Coffee. In: **Coffee in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 189–199.

NEVES, D. B. DA J.; CALDAS, E. D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 194–202, 2017.

NIEBER, K. The Impact of Coffee on Health Author Pharmacokinetics and Mode of Action Bioactive Components in Coffee. p. 1256–1263, 2017.

NOONIM, P. et al. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 197–202, 2008.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Chemical Characterization of the High Molecular Weight Material Extracted with Hot Water from Green and Roasted Arabica Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1773–1782, 2001.

OCHIAI, R. et al. Green Coffee Bean Extract Improves Human Vasoreactivity. **Hypertension Research**, v. 27, n. 10, p. 731–737, 2004.

OLIVEIRA, L. S. et al. Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 235–239, 2006.

ONAKPOYA, I.; TERRY, R.; ERNST, E. **The use of green coffee extract as a weight loss supplement: A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials** *Gastroenterology Research and Practice*, 2011.

Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A in food. **EFSA Journal**, v. 4, n. 6, p. 365, jun. 2006.

PAULINO DE MORAES, M. H.; LUCHESE, R. H. Ochratoxin A on green coffee: Influence of harvest and drying processing procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5824–5828, 2003.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. (AILSA D. **Fungi and food spoilage**. [s.l.] Blackie Academic & Professional, 1997.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. **The genus**

Aspergillus., 1965.

REVUELTA-INIESTA, R.; AL-DUJAILI, E. A. S. Consumption of Green Coffee Reduces Blood Pressure and Body Composition by Influencing 11 β -HSD1 Enzyme Activity in Healthy Individuals: A Pilot Crossover Study Using Green and Black Coffee. **BioMed Research International**, v. 2014, n. ii, 2014.

RODRIGUEZ DE SOTILLO, D. V.; HADLEY, M.; SOTILLO, J. E. Insulin receptor exon 11+/-is expressed in Zucker (fa/fa) rats, and chlorogenic acid modifies their plasma insulin and liver protein and DNA. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 63–71, 2006.

ROMANI, S. et al. Screening on the Occurrence of Ochratoxin A in Green Coffee Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3616–3619, 2000.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141–73, jun. 2014.

ŞEMEN, S. et al. Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake. **Food Chemistry**, v. 215, p. 92–100, 2017.

SHIMODA, H.; SEKI, E.; AITANI, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 1–9, 2006a.

SHIMODA, H.; SEKI, E.; AITANI, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2006b.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. DA. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 1, p. 21–32, 1999.

TAJIK, N. et al. **The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature** *European Journal of Nutrition*, 2017.

TANAKA, K. et al. Anti-Obesity and Hypotriglyceridemic Properties of Coffee Bean Extract in SD Rats. **Food Sci. Technol. Res**, v. 15, n. 2, p. 147–152, 2009.

THOM, E. The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People. **Journal of International Medical Research**, 2007.

TURNBULL, D. et al. Caffeine and cardiovascular health. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 89, p. 165–185, 2017.

VACLAVIK, L. et al. Determination of multiple mycotoxins in dietary supplements containing green coffee bean extracts using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013.

VATINNO, R. et al. Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, n. 1–2, p. 145–150, 2008.

WATANABE, K. et al. Consumer health benefits of habitual consumption of chlorogenic acid-enriched coffee: a large single-arm study. **Nutrafoods**, 2014.

WONTNER-SMITH, T. J. et al. Ochratoxin A production during ambient-air drying. **Journal of Stored Products Research**, v. 56, p. 1–7, 1 jan. 2014.

WRIGHT, G. A. et al. Caffeine in Floral Nectar Enhances a Pollinator's Memory of Reward. [s.d.].

YASHIN, A. et al. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 2, n. 4, p. 230–45, 15 out. 2013.

ZULLI, A. et al. **Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research** *European Journal of Nutrition*, 2016.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310–316, 2009.

ANEXO A

- 100mg das amostras foram pesadas em microtubos novos em balança analítica, em seguida é adicionado 1mL de tampão CTAB e misturado com um loop
- Adicionado com pipeta automática 20µL de proteinase K, em seguida, será levado a banho termoeestático e incubado por 90 minutos à 65°C com retirada a cada 15 minutos para homogeneização em vortex
- Em seguida, será adicionado 20µL de RNase e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos e em banho termoeestático por 5 minutos
- Amostras serão centrifugadas à 13000RPM por 10 minutos em temperatura ambiente
- 500µL vão ser retirados do microtubo e transferidos para outro microtubo contendo 500µL de cloroformio e agitado em vortex para homogeneização
- Logo após, amostras serão centrifugadas a 13000rpm por 10 minutos para que ocorra separação de fases
- Após separação de fases, será retirado em torno de 500µL do filme superior e transferido para outro microtubo e adicionado 2 volumes de solução de precipitação CTAB e incubados por 90 minutos em temperatura ambiente
- Em seguida tubos serão centrifugados por 10 minutos a 13000RPM. O sobrenadante será descartado e o precipitado será dissolvido em 350µL de NaCl 1,2M
- Em seguida, será adicionado cloroformio e misturado por 30 segundos em vortex, em seguida, centrifugada nas mesmas condições supracitadas.
- Filme superior será transferido para microtubo novo e adicionado igual volume de isopropanol gelado. Amostras serão homogeneizadas e acondicionadas e à -20°C por uma noite
- Amostras serão centrifugadas a 13000RPM por 10 minutos e sobrenadante será descartado
- Pellets serão secos por inversão do tubo em papel absorvente, em seguida será adicionado etanol 70% gelado, tubos agitados e centrifugados por 10 minutos a 13000RPM e sobrenadante será descartado e pellets serão secos em capela de fluxo laminar por 1 e ½ hora
- Amostras serão dissolvidas em água miliQ esterilizada e acondicionadas à -20°C