

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/04/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e
Bioprocessos

Mestrado Profissional

ISABELA DE OLIVEIRA CARVALHO PEREIRA

OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE CAFÉ VERDE

ARARAQUARA/SP

2019

ISABELA DE OLIVEIRA CARVALHO PEREIRA

OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE CAFÉ VERDE

Dissertação apresentada ao Conselho, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp/Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

Orientador: Cristiano Soleo de Funari

Coorientador: William de Melo Silva

ARARAQUARA/SP

2019

P428o Pereira, Isabela de Oliveira Carvalho.
Otimização de processo de extração de café verde / Isabela de
Oliveira Carvalho Pereira. – Araraquara, 2019.
52 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

Orientador: Cristiano Soleo de Funari.
Coorientador: William de Melo Silva.

1. Café verde. 2. Cafeína. 3. Ácido Clorogênico. 4. Planejamento
de Doehlert. 5. UHPLC-PAD/UV. I. Funari, Cristiano Soleo de, orient. II.
Silva, William de Melo, coorient. III. Título.

RESUMO

O café conquistou o paladar de inúmeros povos, em diversas regiões do planeta, devido às suas características sensoriais e o seu poder estimulante. É uma planta arbustiva, com duas espécies principais, a *Coffea arabica* L. e a *Coffea conephora* L. As duas espécies de café verde mais consumidas e exploradas diferem entre si pelas suas características organolépticas, físicas e químicas. O café arábica possui aroma e sabor mais apreciado, e suas aplicações estão nas bebidas. Já o café robusta é utilizado pelo segmento farmacêutico, devido aos seus mais altos teores de ácido clorogênico e cafeína. O alto consumo mundial do café verde tem estimulado o desenvolvimento de estudos relacionados aos constituintes do café, como a cafeína e o ácido clorogênico, e também os estudos relacionados à atividades biológicas. Nas últimas décadas, aumentou consideravelmente a busca por compostos bioativos de origem natural, e diversos métodos extrativos estão sendo utilizados com o objetivo de extrair a maior quantidade de princípios ativos oriundos das plantas vegetais. Visando desenvolver um novo extrato de café verde com maior teor de cafeína e ácido clorogênico, o presente trabalho tem por objetivo otimizar um processo de extração de grãos verdes de *Coffea conephora* L. com o intuito de se obter teores de cafeína e de ácido clorogênico superiores aos obtidos pela empresa Centroflora Nutra. Inicialmente, foi desenvolvido um método de análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrofotômetro UV (UHPLC-PAD/UV), a partir de uma amostra de extrato de café verde comercializado pela empresa. E seguida, um planejamento de Doehlert, com quatro variáveis (tempo, temperatura, razão solvente/planta, solvente), foi construído e executado com o intuito de se maximizar o processo de extração por marceração dinâmica. As respostas monitoradas foram área sob os picos correspondente à cafeína e ao ácido clorogênico, obtidas por UHPLC-PAD/UV. O ponto ótimo foi atribuído a um dos experimentos executados no planejamento Doehlert original, com as seguintes condições: 75 min, razão solvente/planta igual a 4, EtOH-H₂O (55:45 v/v) com solução extratora, a 60°C.

Palavras-chave: Café verde. Cafeína. Ácido Clorogênico. Planejamento de Doehlert. UHPLC-PAD/UV

ABSTRACT

Coffee has conquered the palate of countless peoples, in diverse regions of the planet, due to its sensorial characteristics and its stimulating power. It is a shrub, with two main species, *Coffea arabica* L. and *Coffea conephora* L. The two most consumed and exploited green coffee species differ in their organoleptic, physical and chemical characteristics. Arabica coffee has the most appreciated aroma and flavor, and its applications are in beverages. Robusta coffee is used by the pharmaceutical segment, due to its higher contents of chlorogenic acid and caffeine. The high world consumption of green coffee has stimulated the development of studies related to coffee constituents, such as caffeine and chlorogenic acid, as well as studies related to biological activities. In the last decades, the search for bioactive compounds of natural origin has increased considerably, and several extractive methods are being used with the objective of extracting the greatest amount of active principles from plant plants. Aiming to develop a new green coffee extract with higher caffeine and chlorogenic acid content, the present work aims to optimize a process of extraction of green grains of *Coffea conephora* L. in order to obtain higher levels of caffeine and chlorogenic acid those obtained by Centroflora Nutra. Initially, an ultra high performance liquid chromatography coupled to a UV spectrophotometer (UHPLC-PAD / UV) analysis method was developed from a sample of green coffee extract marketed by the company. Then, a Doehlert planning, with four variables (time, temperature, solvent / plant ratio, solvent), was constructed and executed in order to maximize the extraction process by dynamic maceration. The monitored responses were areas under the caffeine and chlorogenic acid peaks obtained by UHPLC-PAD / UV. The optimal point was assigned to one of the experiments performed in the original Doehlert design, with the following conditions: 75 min, solvent / plant ratio equal to 4, EtOH-H₂O (55:45 v / v) with extractive solution, at 60 ° C.

Keywords: Green coffee. Caffeine. Chlorogenic Acid. Doehlert Planning. UHPLC-PAD / UV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da cafeína.	16
Figura 2. Estrutura química do ácido clorogênico.	17
Figura 3. Estrutura química da trigonelina.	17
Figura 4. Fluxograma do processo de extração referente a otimização dos grãos de café verde.....	25
Figura 5. Fluxograma do processo de extração do bagaço dos grãos de café verde, proveniente dos experimentos 10 e 22.	30
Figura 6. Cromatograma UHPLC-UV dos padrões de cafeína e ácido clorogênico (cromatograma superior) e do extrato de café verde comercializado da Centroflora, diluído com água e metanol, visualizado a 280 nm. As condições cromatográficas foram aquelas descritas por Castro et al. (2018): fase estacionária: C18 BEH Waters (2,1 x 100 mm; 1,7 µm). Componentes da fase móvel: 2,0% (v/v) AcOH em H ₂ O e 0,5% AcOH em H ₂ O e MeCN 50:50 (v/v) nas seguintes eluições de gradiente de 10-12% B (0-1,5 min), 12% B (1,5-3,5 min), 12-40% B (3,5-4,5 min), 40% B (4,5-7,5 min), 40-100% B (7,5-8,7 min), 100-10% B (8,5-9,5%), 10%B (9,5-11,5). Vazão de 0,55 mL/min. Temperatura de análise: 30°C. Volume de injeção de 1µL. Concentração da Amostra: 20 mg/mL.	32
Figura 7. Cromatograma UHPLC-UV das condições analíticas A, B, C e D, referente ao extrato de café verde, visualizado a 280 nm. As condições cromatográficas estão representadas na Tabela 6.....	34
Figura 8. Comparação do gradiente as condições analíticas em relação à concentração de metanol.....	35
Figura 9. Comparação entre os cromatograma UHPLC-UV do método analítico de Castro et al. (2018) e da condição analítica D, visualizado a 280 nm. As condições cromatográficas foram aquelas descritas no item 4.4.....	37
Figura 10. Cromatograma UHPLC-UV referente ao bagaço proveniente do experimento 22 (escala industrial e bancada) e 10, extraído com etanol 70%, visualizado a 280 nm. As condições cromatográficas estão descritas no item 4.4.	43
Figura 11. Cromatograma UHPLC-UV referente ao bagaço proveniente do experimento 22 (escala industrial) extraído com etanol 70% e acetato de etila, visualizado a 280 nm. As condições cromatográficas estão representadas no item 4.4.....	45
Figura 12. Cromatograma UHPLC-UV referente ao bagaço proveniente do experimento 22 (escala industrial) extraído com etanol 70%, visualizado a 280 nm. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 11.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características genéticas, químicas, botânicas e agronômicas das espécies <i>C.arabica</i> e <i>C. conephora</i>	12
Tabela 2. Composição química de grãos de café verde e torrados (arábica e robusta).....	15
Tabela 3. Compostos minerais da casca de frutos do cafeeiro, em relação à matéria seca.	21
Tabela 4. Planejamento Experimental do tipo Doehlert com quatro variáveis.	26
Tabela 5. Comparação entre as condições de eluição do artigo Castro et al. (2018) com a condição D.....	28
Tabela 6. Comparação entre os gradientes das condições analíticas A, B, C e D.	35
Tabela 7. Resultados das áreas de cafeína e ácido clorogênico obtidas para as condições analíticas e a resolução entre os picos (Rs) do par crítico (pico de interesse com o pico anterior).	36
Tabela 8. Dados referentes aos sólidos totais e teores de cafeína e ácido clorogênico proveniente das extrações do experimento 10 e 22.	40
Tabela 9. Dados referentes aos sólidos totais e teores de cafeína e ácido clorogênico proveniente dos concentrados obtidos pelos experimentos 10 e 22.	41
Tabela 10. Comparação entre os sólidos totais e áreas de cafeína e ácido clorogênico proveniente das extrações do bagaço, proveniente do experimento 22 (escala industrial), com etanol 70% e acetato de etila.	44
Tabela 11. Gradiente referente às proporções das fases móveis A e B do método desenvolvido para melhor separação dos picos após 12 min.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOH - Ácido Acético

EtOH - Etanol

H₂O – Água

FE – Fase Estacionária

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

MeCN - Acetonitrila

MeOH - Metanol

Rs: Resolução

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UV- Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1.	O Café	11
2.2.	Produção e consumo do café	13
2.3.	Composição química do café.....	14
2.4.	Processo de Extração.....	18
2.5.	Planejamento Experimental	19
2.6.	Resíduo de Café Verde	20
2.7.	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Materiais e Equipamentos	23
4.2	Material Vegetal.....	23
4.3	Otimização do processo de extração do Café Verde	24
4.4	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência	28
4.5	Determinação de Resíduo Seco	29
4.6	Extração do Bagaço de Café Verde.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Desenvolvimento da Condição Analítica	31
5.2	Processo de Extração das sementes de Café verde	38
5.3	Análise do Bagaço de Café Verde	43
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

O café representa grande importância econômica nas indústrias de alimentos, sendo a bebida mais consumida e apreciada no mundo devido às suas características sensoriais e pela sua ação estimulante. Possui duas espécies principais, a *Coffea arabica* L. (conhecida como café arábica) e a *Coffea conephora* L. (conhecida como café robusta), e são responsáveis por 32% do mercado internacional, sendo o segundo produto mais comercializado no mundo, depois do petróleo. (FERRÃO, 2004; ABIC, 2013).

As duas espécies de café verde diferem entre si pelas suas características químicas, físicas, organolépticas e botânicas. A *C. arabica* possui aroma e sabor mais apreciado que a *C. conephora*, e devido a isso, a *C. arabica* representa cerca de 70% da produção mundial e é mais aceita no segmento alimentício, principalmente nas aplicações em bebidas (FERRÃO, 2004; ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Já os grãos de café verde robusta possuem maiores teores de cafeína e ácido clorogênico, sendo mais utilizados em extrações para aplicações em medicamentos, os quais são padronizados nesses princípios ativos e responsáveis pelo poder estimulante e ação antioxidante, que são provenientes da cafeína e do ácido clorogênico, respectivamente. Sabe-se, também, que o ácido clorogênico é responsável por acelerar o metabolismo energético, contribuindo com a redução do peso corporal, e atuar na atividade antimicrobiana (FERRÃO, 2004; ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; STELMACH et al., 2015).

Desta forma, o estudo ora apresentado teve como objetivo otimizar o processo de extração de grãos verdes de *Coffea conephora* L., com intuito de se obter teores de cafeína e de ácido clorogênico acima de 10% e 15%, respectivamente. Ou seja, superiores aos teores hoje alcançados com o processo extrativo vigente.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que a abordagem multivariada aqui empregada resultou em uma melhora significativa e satisfatória na eficiência de extração de cafeína e ácido clorogênico de café verde em relação ao processo em operação na empresa Centroflora Nutra. Essa abordagem demonstrou vantagem em relação à abordagem “tentativa e erro” utilizada para o desenvolvimento do processo de extração hoje vigente na empresa.

Além disso, a condição aqui desenvolvida (experimento 10) utiliza uma menor quantidade de planta e solvente do que o processo atual. Esses dados serão apresentados para a empresa com o intuito de substituir o processo de extração atual, para que a mesma consiga reduzir o tempo de processo e, além disso, aumentar a sua eficiência no processo extrativo.

O desenvolvimento do método analítico de UHPLC-PAD/UV, com alteração na eluente B para metanol, foi eficiente para eliminar o uso de acetonitrila e melhorar a separação dos compostos de interesse.

Os resíduos obtidos pelos processos de extração desse trabalho foram também analisados, e foi possível identificar e quantificar a cafeína e ácido clorogênico, sendo importante para verificar possíveis aplicações, como por exemplo, gerar um novo extrato de café verde, com menor teor de cafeína e ácido clorogênico, mas com um custo menor do que o extrato que existe no portfólio da empresa, ou então, utilizá-lo para o segmento alimentício, visando à quantificação em altos teores de proteínas e/ou lipídeos.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos Bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.12, p. 1799 – 1804, 2008.

ALVES R. C.; CASA S.; OLIVEIRA B. Benefícios do Café na Saúde: Mito ou Realidade?. **Química Nova**, v. 32, n.10, p. 2169 – 2180, 2009.

BARCELOS, A.F.; PEREZ, J.R. Composição da casca e polpa desidratada de café (*Coffea arabica* L.) armazenada em diferentes períodos. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS NO BRASIL, 2., 2001.Vitória, ES. **Anais** [...]. Brasília, DF: Embrapa Café, 2001. p. 818-825. Disponível em: http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1065/155585_Art112f.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401 – 1406, 2006.

BÁRTHOLO, Gabriel F. et alii. Cuidados na colheita, no preparo e no armazenamento do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 14, n. 162, p. 33-44, 1989.

BICC. Relatório Internacional de Tendências do Café. **Lavras: Bureau de Inteligência Competitiva do Café**, v. 5, n. 12, p. 12, 2017.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília, 2013.

BRANDÃO, V.S.; MATOS, A.T.; MARTINEZ, M.A.; FONTES, M.P.P. Tratamento de águas residuárias de suinocultura utilizando-se filtros orgânicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v.4, n.3, p.327-333, 2000.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica Y de Farmacognosia**. 1 ed. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1991.

CASAL, S.; OLIVEIRA, B.; FERREIRA, M. A. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. **Food Chemistry**, London, v. 68, n. 4, p. 481-485, 2000.

CASTRO, A.C.C.M.; ODA, F.B.; ALMEIDA-CINCOTTO, M.G.J.; DAVANÇO, M.G.; CHIARI ANDRÉO, B.G.; CICARELLI, R.M.B.; PECCININI, R.G.;

ZOCOLO, G.J.; RIBEIRO, P.R. V.; CORRÊA, M.A.; ISAAC, V.L.B.; SANTOS, A.G. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, 246, p. 48–57, 2018.

CLARKE, R.J.; MACRAE, K. **Coffee volume 2**. London: Elsevier, 1989.

CLAUDE, B. Étude bibliographique: utilisation des sous-produits du café. **Café CacaoThé**, Paris, v. 23, n. 2, p. 146-152, 1979.

COLLINS, C. H. Pilares da cromatografia: Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. **Scientia Chromatographica**, v.1, n. 1, p. 7-20, 2009. Disponível em:

<http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n1a1.pdf>.

CRUZ, G.L. **Dicionário de Plantas Úteis no Brasil**. 5 ed. Rio de Janeiro: Bertrand, Brasil, 1995.

DEMARCHI, M. **Café: aspectos econômicos**. Curitiba: SEAB, 2001.

FARAH, A. et al. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, Easton, v.53, p. 1505-1513, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

FERRÃO, A. M. A. **Arquitetura do café**. Campinas: UNICAMP, 2004. 296 p.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; DA SILVA, E. G.; DOS SANTOS, W. N.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; DE ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography. A**, v. 1158, n. 1-2, p. 2 -14, 2007.

FOSTER R.H., HARDY G. e ALANY R.G. Borage oil in the treatment of atopic dermatitis. **Nutrition**, v.26, n. 7-8, p. 719-720, 2010.

FUNARI, C.S., CARNEIRO, R. J., CREESE, M. E.; LEME, G. M.; CAVALHEIRO, A. J., HILDER, E. F. On track for a truly green propolis – Fingerprinting Propolis Samples from seven countries by means of a fully green approach. **ACS Sustainable Chem. Eng**, v. 4, p. 7110 – 7117, 2016.

FUNARI, C.S.; EUGSTER, P.J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P.A.; WOLFENDER, J.L.; SILVA, D.H.S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian Lippia species. **Journal of Chromatography. A**, v. 1259, p. 167–178, 2012.

GIL-CHÁVEZ, G.J. et al. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Reviews In Food Science And Food Safety**, v.12, n.1, p.5–23, 2013.

ILLY, A; VIANI, R. **Espresso Coffee: the chemistry of quality**. 2nd. ed. London: Academic Press, 1996.

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**, São Paulo, v.33, n.1, p. 20-24, 2010.

LÓPEZ, G.I.; PAZ DE PEÑA, I.; CID, C. Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influence of the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oxford, v.55, p. 6110-6117, 2007.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v.4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Compostos voláteis do café torrado: parte I, compostos heterocíclicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 209-217, 1999.

MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.4, p. 637-641, 2005.

MORAIS, S. A. L. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. **Química Nova**, São Paulo, v.32, p.327-331, 2009.

MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C.; DE MARIA, C.A.B. Compostos voláteis do café torrado. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.2, p.195-203, 2000.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.3, 2017.

OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por claudad de *dicksoniasellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 230- 239, 2016.

PANUSA, A., et al. Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4162-4168, 2013.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; Vyvyan, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIMENTA, C.J. **Qualidade de Café**, Lavras: UFLA, 2003.

PIMENTA, C.J.; COSTA, L.; CHAGAS, S.J.R. Peso, acidez, sólidos solúveis, açúcares e compostos fenólicos em café (*Coffea arabica* L), colhidos em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.1, p. 23-30, 2000.

PEREIRA, M.C.; CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, G.R. de; SAVIAN, T.V. Multivariate analysis of sensory characteristics of coffee grains (*Coffea Arabica* L.) in the region of upper Paranaíba. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n.4, p. 635-641, 2010.

PRAT, D., WELLS, A., HAYLER, J., SNEDDON, H., MCELROY, C.R., ABOUSHEHADA, S., DUNN, P.J. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. **Green Chem**, v.18, p. 288–296, 2016.

SALVA, T.J.G.; LIMA, V.B. A composição química do café e as características da bebida e do grão. **O Agrônomo**, Campinas, v.59, n.1, p.57-59, 2007.

SNYDER, L. R. ; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; **Practical HPLC Method Development**. 2nd. ed. New York: Wiley-Interscience, 1997.

STELMACH, E.; POHL, P.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A. The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews. **Food Chemistry**, v.182, p. 302-308, 2015.

TEÓFILO, R. T.; FERREIRA, M. M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338 – 350, 2006.

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L.C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 965-971, 2006.

TRUGO, L.C. Café: composição e potencial nutracêutico. In: MERCADANTE, A. Z. et al. (Ed). **Ciências de alimentos: avanços e perspectivas**. Campinas: Unicamp, 2001. v.2.

ZYLBERSZTAIN, D., FARINA, E.M.M., SANTOS, R. DA COSTA. **O Sistema Agroindustrial do café**. Porto Alegre, Ortiz, 1993.