

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 maceração 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-H<sub>2</sub>O (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-H<sub>2</sub>O (55:45 v / v) with extractive solution, at 60 ° C.

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

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da cafeína. ....	16
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do ácido clorogênico. ....	17
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da trigonelina. ....	17
<b>Figura 4.</b> Fluxograma do processo de extração referente a otimização dos grãos de café verde.....	25
<b>Figura 5.</b> Fluxograma do processo de extração do bagaço dos grãos de café verde, proveniente dos experimentos 10 e 22. ....	30
<b>Figura 6.</b> 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 <sub>2</sub> O e 0,5% AcOH em H <sub>2</sub> 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
<b>Figura 7.</b> 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
<b>Figura 8.</b> Comparação do gradiente as condições analíticas em relação à concentração de metanol.....	35
<b>Figura 9.</b> 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
<b>Figura 10.</b> 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
<b>Figura 11.</b> 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
<b>Figura 12.</b> 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

<b>Tabela 1.</b> Características genéticas, químicas, botânicas e agronômicas das espécies <i>C.arabica</i> e <i>C. conephora</i> . .....	12
<b>Tabela 2.</b> Composição química de grãos de café verde e torrados (arábica e robusta).....	15
<b>Tabela 3.</b> Compostos minerais da casca de frutos do cafeeiro, em relação à matéria seca. ....	21
<b>Tabela 4.</b> Planejamento Experimental do tipo Doehlert com quatro variáveis. ....	26
<b>Tabela 5.</b> Comparação entre as condições de eluição do artigo Castro et al. (2018) com a condição D.....	28
<b>Tabela 6.</b> Comparação entre os gradientes das condições analíticas A, B, C e D.....	35
<b>Tabela 7.</b> 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
<b>Tabela 8.</b> Dados referentes aos sólidos totais e teores de cafeína e ácido clorogênico proveniente das extrações do experimento 10 e 22. ....	40
<b>Tabela 9.</b> Dados referentes aos sólidos totais e teores de cafeína e ácido clorogênico proveniente dos concentrados obtidos pelos experimentos 10 e 22. ....	41
<b>Tabela 10.</b> 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
<b>Tabela 11.</b> 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

H<sub>2</sub>O – 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

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	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
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	Objetivo geral .....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	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
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	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
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	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.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. O Café

O Café é um produto nobre da agricultura do país e ao longo de centenas de anos, conquistou o paladar de inúmeros povos. Teve origem na Abssínia (atual Etiópia) e foi introduzido no Brasil por volta de 1730, diretamente em Belém, seguindo para o Maranhão, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo (CRUZ, 1995; FERRÃO, 2004).

O cafeeiro é uma planta arbustiva e seus frutos vão do verde ao vermelho (maduros), passando pelo amarelo. Pertence ao gênero *Coffea* e à família *Rubiaceae* com duas espécies principais, a *Coffea arabica* L. (conhecida como café arábica) e a *Coffea conephora* L.(conhecida como café robusta). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de grãos de café e desses grãos é obtida uma bebida universal, a qual é uma das mais consumidas no mundo. A *C. arabica* representa cerca de 70% da produção mundial e é característica dos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, enquanto a *C. conephora* representa mais de 25% da produção mundial e é cultivada principalmente no Espírito Santo (FERRÃO, 2004; BRUNETON,1991).

As duas espécies de café verde mais consumidas e exploradas diferem entre si pelas suas características organolépticas, físicas e químicas. O café arábica é um produto de qualidade superior, com aroma e sabor mais apreciado e com uma maior aceitação em todos os mercados, sendo assim, é mais valorizado comercialmente. Já o café robusta, é utilizado para aumentar o corpo e a espuma de algumas bebidas e é mais resistente ao ataque de pragas durante o seu cultivo (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Essas duas espécies também possuem diferenças genéticas, botânicas, morfológicas e agrônômicas, as quais estão representadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características genéticas, químicas, botânicas e agronômicas das espécies *C. arabica* e *C. conephora*.

Parâmetros	<i>C. arabica</i>	<i>C. conephora</i>
Clima ótimo	Temperado	Quente úmido
Temperatura ótima	15 a 24°C	24 a 30°C
Crescimento ótimo (m)	1000 a 2000	0 a 700
Planta	arbusto auto-fertil (autogâmico)	arbusto auto-fertil (autogâmico)
Cromossomos (2n)	44	22
Folha	Pequena, lisa e oval	Grande e larga
Floração	Após o período de chuvas	Irregular
Flor (branca a rosa)	Pequenas	Grandes
Frutos	Cresce em cachos	Cresce em cachos
Semente	Oval, achatada, sulco profundo	Oval para circular
Característica típica da bebida	acidificada	amarga, forte

Fonte: Pimenta (2000); ILLY; VIANI (1996); Clarke e Macrae (1989)

Os cafés robusta e arábica diferem em preço, aceitabilidade e qualidade. Os grãos de café arábica são verdes claros e de forma ovalar, enquanto que o robusta são arredondados e castanhos. No entanto, após o processo de torrefação e moagem, não se pode distinguir as espécies visualmente e nem pelas suas características físico-químicas, pois, como pertencem ao mesmo gênero, às diferenças são pequenas. *Coffea Arabica* além de ser a mais produzida e consumida no mundo, é usada para obtenção de óleo, o qual é rico em ácidos graxos essenciais, como o ácido linoléico, o qual está sendo bastante utilizado nas indústrias de cosméticos, na cura de dermatites e no alívio de eczemas (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; FOSTER, HARDY E ALANY, 2010).

A qualidade do café está relacionada com as propriedades químicas e físicas, as quais são responsáveis pelo sabor e aroma das bebidas, pois os grãos de café verde possuem componentes que são responsáveis por essas características, como as proteínas, ácido clorogênico, ácidos graxos e as enzimas (PERREIRA et al., 2010). Mas também pela multiplicidade de fatores que estão relacionados com o cultivo até o preparo da bebida para o consumo,

já que o processo engloba o momento adequado da colheita, o processamento, beneficiamento, secagem e a torrefação dos grãos, e esses fatores são essenciais para obtenção de um café com notas sensoriais e composições químicas preservadas (PIMENTA, 2003).

## **2.2. Produção e consumo do café**

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e é responsável por 32% do mercado internacional. Segundo a Associação Brasileira de Indústria de Café são 290 mil produtores que fazem parte de associações e cooperativas e os mesmos estão distribuídos em 15 estados brasileiros. Outros países, como: Colômbia, México e Guatemala, estão entre os grandes produtores mundiais, mas com a produção voltada para os grãos de café verde arábica, enquanto na Indonésia, Vietnã, Costa do Marfim, Índia, Uganda e Etiópia, predominam o cultivo da robusta (BRASIL, 2013).

O Estado de Minas Gerais é o maior produtor de café no Brasil, seguido do Espírito Santo, São Paulo e Paraná, com uma produção de 47%, 19%, 13% e 7%, respectivamente (DEMARCHI, 2001). Os grãos do café verde são exportados para os Estados Unidos, Alemanha, Itália e Japão; e o café torrado e moído para os Estados Unidos, Itália, Japão e Argentina (BRASIL, 2013).

O consumo de café representa um hábito mundial e vem aumentando em todo o mundo, devido ao seu sabor e aroma característico e também pela aceitação da bebida. No Brasil, o consumo de café atingiu 20,33 milhões de sacas de 60 kg no período de novembro de 2011 a outubro de 2012, com aumento de 3,09% em comparação com o período anterior, e o consumo *per capita* foi de 4,98 kg de café torrado e 6,23 kg de café em grão cru, com aumento de 2,10% em relação ao período anterior (ABIC, 2013). Esse aumento considerável do café foi devido ao aumento dos cafés especiais e as monodoses. O segmento das doses únicas apresenta diversas possibilidades para preparar diferentes tipos de bebidas, as quais podem ser feitas em casa ou nas cafeterias. E para atender a demanda desse mercado, as empresas

estão investindo em melhores grãos, em tecnologias e diversificação dos seus produtos para atrair os consumidores (BICC, 2017).

### **2.3. Composição química do café**

O café cru e o café torrado possuem uma composição química complexa, visto que possuem cerca de 1.000 componentes químicos (CLARKE; MACRAE, 1989). O processo de torrefação pode ser definido como o tratamento térmico com a finalidade de desenvolver compostos aromáticos e transformar a textura do alimento, facilitando a moagem e em muitos casos a extração com água. Além disso, é nesse processo que é desenvolvido o sabor e o aroma do café produzido nas bebidas (SALVA; LIMA, 2007). Nesse processo, os grãos de café são aquecidos a temperaturas de 180 – 240°C com tempo a ser determinado segundo as propriedades sensoriais desejáveis do produto, e diversas transformações químicas ocorrem devido às altas temperaturas utilizadas nessa etapa. Os ácidos clorogênicos reagem durante esse processo e produzem compostos ácidos e lactonas, os quais contribuem para a acidez e adstringência da bebida. A cafeína não apresenta diferenças significativas em relação a torra, sendo o seu composto mais estável que os ácidos clorogênicos, como pode ser observado pelos dados contidos na Tabela 2 (LÓPEZ et al., 2007; FARAH et al., 2005).

**Tabela 2.** Composição química de grãos de café verde e torrados (arábica e robusta).

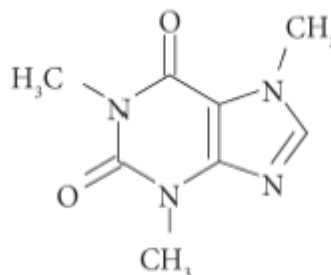
Componentes	<i>C. arabica</i>	<i>C. arabica</i>	<i>C. conephora</i>	<i>C. conephora</i>
	Verde (g/100g)	Torrado (g/100g)	Verde (g/100g)	Torrado (g/100g)
Cafeína	0,9 – 1,2	1,0	1,6 – 2,4	2,0
Trigonelina	1,0 – 1,2	0,5 – 1,0	0,6 – 0,75	0,3 – 0,6
Minerais	3,0 – 4,2	3,0 – 4,5	4,0 – 4,5	4,6 – 5,0
Ácidos Clorogênicos	5,5 – 8,0	1,2 – 2,3	7,0 – 10,0	3,9 – 4,6
Totais				
Ácidos alifáticos	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5
Oligossacarídeos	6,0 – 8,0	0 – 3,5	5,0 – 7,0	0 – 3,5
Polissacarídeos	50,0 – 55,0	24,0 – 39,0	37,0 – 47,0	25,0 – 37,0
Proteínas	11,0 – 13,0	13,0 – 15,0	11,0 – 13,0	13,0 – 15,0
Aminoácidos	2,0	0,0	2,0	0,0
Lipídeos	12,0 – 18,0	14,5 – 20,0	9,0 – 13,0	11,0 – 16,0

Fonte: Clarke e Macrae (1989)

Durante a torrefação dos grãos de café, as proteínas são desnaturadas e degradadas em moléculas menores, as quais auxiliam na geração dos pigmentos. Além disso, essas proteínas também podem reagir com os carboidratos, através da reação de *Maillard* (a qual envolve a condensação do grupo carbonila de açúcares redutores com o grupo amino das proteínas), originando compostos voláteis, os quais são importantes pelo *flavor*, e conseqüentemente, para a qualidade do café torrado (TRUGO, 2001; TOCI; FARAHA; TRUGO, 2006).

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 atividade biológica (LIMA et al., 2010). A cafeína, identificada como 1,3,7 - trimetilxantina, é um alcalóide do grupo das xantinas, e é a substância estimulante mais utilizada no mundo, cuja a estrutura contém um esqueleto de purina (Figura 1) (TOCI; FARAHA; TRUGO, 2006). É inodora e possui sabor amargo característico, o qual contribui com a nota de amargor para as bebidas oriundas do café (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Essa substância desperta interesse devido ao seu poder sobre o metabolismo energético, atuando como um

agente estimulante sobre o sistema nervoso central e também nos efeitos psicoativos (PANUSA et al., 2013).

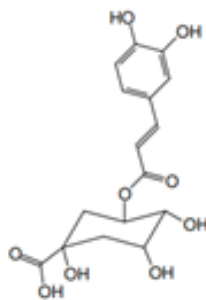


**Figura 1.** Estrutura química da cafeína.

Fonte: Moraes et al. (2009)

Os compostos fenólicos são responsáveis pelas notas adstringentes dos frutos e contribuem de maneira significativa para o aroma e o sabor, e essas notas sensoriais são adquiridas no processo de torrefação dos grãos, pois ocorre a degradação desse componente (ABRAHÃO et al., 2008; MOREIRA, TRUGO, DE MARIA, 2000). O ácido hidroxicinâmico mais comum encontrado nos grãos de café é o ácido clorogênico (Figura 2). O mesmo é identificado como ácido 5-cafeoilquínico ou 5-CQA, está relacionado com a atividade antimicrobiana, e também atua como hipotensor e antioxidante. Os produtos ricos em antioxidantes são responsáveis por prevenir certas doenças e melhorar a saúde, e devido a isso, o café verde tem se tornado popular no mundo (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Acredita-se também que as infusões do café aceleram o metabolismo e ajudam na redução do peso corporal (STELMACH et al., 2015).

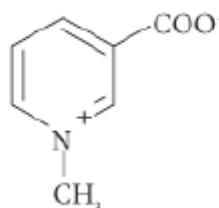




**Figura 2.** Estrutura química do ácido clorogênico.

Fonte: Morais et al. (2009)

A trigonelina é uma N-metil betaína (Figura 3), a qual pertence à classe dos alcalóides, como a cafeína, e tem grande importância do ponto de vista sensorial e nutricional. Essa substância desperta interesse devido ao seu poder sobre o metabolismo energético e sobre a secreção da bile e da mobilidade intestinal (CLARKE, MACRAE, 1989). Na sua degradação térmica, proveniente do processo de torrefação, ocorre à formação de importantes compostos para o aroma do café, como os pirróis e piridinas. Além disso, é convertida também em niacina, a qual ocasiona o aumento no valor nutricional após o processo térmico (CASAL et al., 2000; MARIA, MOREIRA, TRUGO, 1999).



**Figura 3.** Estrutura química da trigonelina.

Fonte: Morais et al. (2009)

Os lipídeos estão relacionados à qualidade da bebida, à coloração dos grãos crus e a exploração do produto para outros fins (SALVA, LIMA, 2007). Os triacilglicerídeos representam a maior quantidade de lipídeos e são responsáveis por aproximadamente 75% da composição. No processo de

torrefação, os lipídeos sofrem degradação oxidativa, a qual é responsável pela formação de alcoóis (metanol e etanol), aldeídos e componentes voláteis (CLARKE, MACRAE, 1989; TOCI, FARAH, TRUGO, 2006).

## 2.4. Processo de Extração

A busca por compostos bioativos de origem natural aumentou consideravelmente nas últimas décadas, e devido a isso, diversos métodos extrativos estão sendo utilizados com o objetivo de extrair a maior quantidade de princípios ativos oriundos das plantas vegetais. Os métodos de extração mais utilizados e conhecidos são: maceração, infusão, percolação, decocção, extração contínua quente (Soxhlet), extração em contracorrente, fluido supercrítico, turbólise e a extração assistida por micro-ondas e ultrassom (GIL-CHÁVEZ et al., 2013; TIWARI et al., 2011).

O processo de maceração consiste na extração da matéria-prima vegetal em recipientes fechados, com temperatura ambiente, durante um período de horas ou dias. Esse tipo de extração não conduz ao esgotamento da matéria-prima, devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula (OLIVEIRA; ZUCHETTO; OLIVEIRA; PAULA; DUARTE; MIGUEL, 2016). Esse processo pode conter variações para que ocorra o aumento na eficiência de extração, como:

- Digestão: Processo de maceração, realizado em sistemas aquecidos a 40 – 60°C.
- Maceração Dinâmica: Processo de maceração feita sob agitação mecânica constante.
- Remaceração: Processo de maceração com repetição, renovando-se apenas o líquido extrator.

Existem diversos fatores que influenciam a eficiência da extração, como: a parte do material vegetal utilizado, o tamanho da sua partícula (granulometria da planta), o solvente utilizado, o tempo de extração, a temperatura, a

polaridade e a concentração do solvente (NOVAES; YAMAKI; DE PAULA; DO NASCIMENTO JÚNIOR; BARRETO; VALASQUES, 2017). Além disso, a escolha do processo extrativo tem que ser avaliada junto com o material que será extraído, no caso a matéria-prima vegetal, pois, diversas plantas possuem ativos que podem ser degradados com a utilização de altas temperaturas, como é o caso do ácido clorogênico. Outro ponto importante é a escolha do solvente extrator, já que dependendo da estrutura química do princípio ativo é mais eficiente escolher o solvente que tenha polaridades semelhantes.

## **2.5. Planejamento Experimental**

Os planejamentos experimentais estão sendo cada vez mais usados na indústria com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de processos e extrações mais eficientes e melhores produtos, pois podem levar a uma otimização global em detrimento a uma otimização local, máximo alcançável pela tradicional abordagem “tentativa e erro”. Esses planejamentos podem ser usados para qualquer processo ou desenvolvimento, desde que tenha dois parâmetros, com valores máximos e mínimos e que sejam atribuídos a uma resposta. Em qualquer planejamento experimental, deve-se decidir quais serão os fatores (variáveis) a serem controlados, os seus níveis a serem testados e qual é a resposta a ser otimizada (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2006; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Existem diversos planejamentos experimentais, os quais possuem a função de alterar propositalmente as variáveis de entrada de um sistema ou processo, com o intuito de avaliar as possíveis alterações sofridas nas variáveis respostas. Os planejamentos experimentais mais usados para o ajuste de funções quadráticas são: Composto Central, Doehlert e Box-Behnken.

O planejamento composto central é formado pela combinação de três partes, um planejamento fatorial de dois níveis fracionário ou completo, pontos axiais e o ponto central. Para a sua construção, deve-se definir o número de

fatores a serem otimizados, o tipo de planejamento fatorial e o número de réplicas do ponto central. O planejamento de Box-Behnken requer poucas combinações de fatores, os quais são estudados em três níveis (-1, 0 e +1), no entanto, esse modelo não estuda as condições experimentais extremas e não obtém uma matriz para duas variáveis.

O Planejamento de Doehlert é um planejamento uniforme onde seus pontos experimentais são igualmente espaçados em círculos (duas variáveis), esférico (três variáveis) e hiperesférico para mais de três variáveis. Cada planejamento é definido considerando o número de variáveis e os valores codificados da matriz experimental. Os planejamentos de Doehlert mostram-se adequados e vantajosos pelos seguintes motivos: são facilmente aplicadas as variáveis experimentais e demandam poucos experimentos para alcançar as respostas, a construção dos planejamentos é sequencial em direção à região onde a resposta máxima é esperada e a quantidade de níveis relacionados a cada fator pode ser selecionada para obter maiores informações sobre os fatores mais significativos (NOVAES; YAMAKI; DE PAULA; DO NASCIMENTO JÚNIOR; BARRETO; VALASQUES, 2017).

## **2.6. Resíduo de Café Verde**

Nas usinas de beneficiamento, são geradas grandes quantidades de resíduos, os quais são provenientes da separação dos grãos. Essa separação é realizada em máquinas, e as mesmas limpam, descascam e separam esses grãos por diferença de tamanho, densidade e cores (ZYLBERSZTAJN et al, 1993). No entanto, nesse processamento ocorre a formação de grandes quantidades de cascas de café, que podem ser utilizada como adubo orgânico, pois, são ricas em potássio, cálcio, manganês e outros nutrientes, conforme os dados da Tabela 3, e por isso, esse material pode ser utilizado para a adubação orgânica, com ganhos econômicos e ambientais. As cascas de café também podem ser utilizadas para rações de animais, formação de carvão e combustível.

**Tabela 3.** Compostos minerais da casca de frutos do cafeeiro, em relação à matéria seca.

<b>Compostos</b>	<b>Conteúdo (g/kg)</b>
Nitrogênio	14,7
Fósforo	1,7
Potássio	36,6
Cálcio	8,1
Magnésio	1,2
Enxofre	1,4
Manganês	0,125
Zinco	0,030
Cobre	0,025

Fonte: Brandão et al. (2000)

Além disso, o pergaminho, de natureza celulósica, representa 12% do peso seco das cerejas, e é o principal constituinte do endocarpo do fruto (CLAUDE, 1979) e representa 25% sobre o peso do café beneficiado (BÁRTHOLO et al., 1989), e o mesmo pode ser utilizado para as mesmas aplicações das cascas de café. Esses resíduos, casca de café e pergaminho, são gerados pelo processamento do café por via seca. Já o processamento por via úmida, é gerado os resíduos de polpa e mucilagem. A polpa é componente do epicarpo e do mesocarpo, e pode ser usada para rações animais e adubos, e a mucilagem, parte do mesocarpo, é eliminada por fermentação natural, e pode ser usada para meio de cultura e por possuir altas concentrações de pectina, pode ser usada para fins industriais (CLAUDE, 1979). Após a etapa de eliminação dos resíduos, o segundo processamento do café seria a torrefação e moagem dos grãos, e depois desses processos, o mesmo é distribuído para as indústrias.

No caso desse estudo, o resíduo de interesse é o gerado após etapa de extração desses grãos de café, pois, atualmente nas empresas, esses resíduos acabam não sendo utilizados para outros fins e acabam sendo descartados. Entretanto, os mesmos podem conter substâncias reutilizáveis de alto valor, as quais podem ser convertidas em produtos comerciais, assim, uma importante vertente da química verde é converter os resíduos gerados nas extrações, a partir de tecnologias verdes, em matérias-primas de produtos de maiores

valores agregados, de interesse, por exemplo, das indústrias farmacêuticas, alimentícias e a de cosmético (BARCELOS; PEREZ, 2001).

## **2.7. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência**

As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação e quantificação dos marcadores químicos contidos nas plantas. Isso é devido à sua capacidade de separação eficiente dos componentes presentes nas misturas e o poder de resolução das colunas modernas (Collins, 2009).

A HPLC, assim como outras técnicas cromatográficas, é uma técnica de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são divididos entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da eluente sobre a estacionária, os componentes são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferentes destes compostos (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ; VYVYAN, 2010).

De forma a obter uma maior eficiência e rapidez na separação dos compostos, desenvolveu-se uma nova modalidade de cromatografia líquida, a cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. A UHPLC tem os mesmos princípios de separação da HPLC, mas com diferença em suas colunas cromatográficas, visto que as colunas empregadas nesta técnica são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e 1-2,1 mm de diâmetros internos) e recheadas com partículas de  $FE \leq 2 \mu\text{m}$ . Devido ao tamanho dessas partículas e as altas velocidades lineares da fase móvel, a resolução e a detectabilidade aumentam e o tempo de análise diminui. Outra vantagem em relação à HPLC é uma economia na fase estacionária e na eluente, com pequeno volume de amostra e menor geração de resíduos (MALDANER; JARDIM, 2012).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

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.

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Materiais e Equipamentos

- Acetonitrila, grau HPLC, Merck
- Acetato de etila, PA, Synth
- Ácido Clorogênico, 97,30%, USP
- Ácido Acético, PA, Synth
- Acquity UHPLC, Waters
- Água destilada e deionizada
- Cafeína, 99,8%, USP
- Etanol, PA, Synth
- Metanol, grau HPLC, Merck

#### 4.2 Material Vegetal

As sementes de café verde (*Coffea robusta* L.) utilizada nesse trabalho foram fornecidas pela empresa Centroflora Nutra, localizada na cidade de Botucatu (estado de São Paulo, Brasil), em janeiro de 2018. As sementes passaram pelo processo de secagem e foram moídas através do moinho de inox com os seguintes parâmetros:

- Peneira: 19 mm
- Rotação: 1.800 rpm

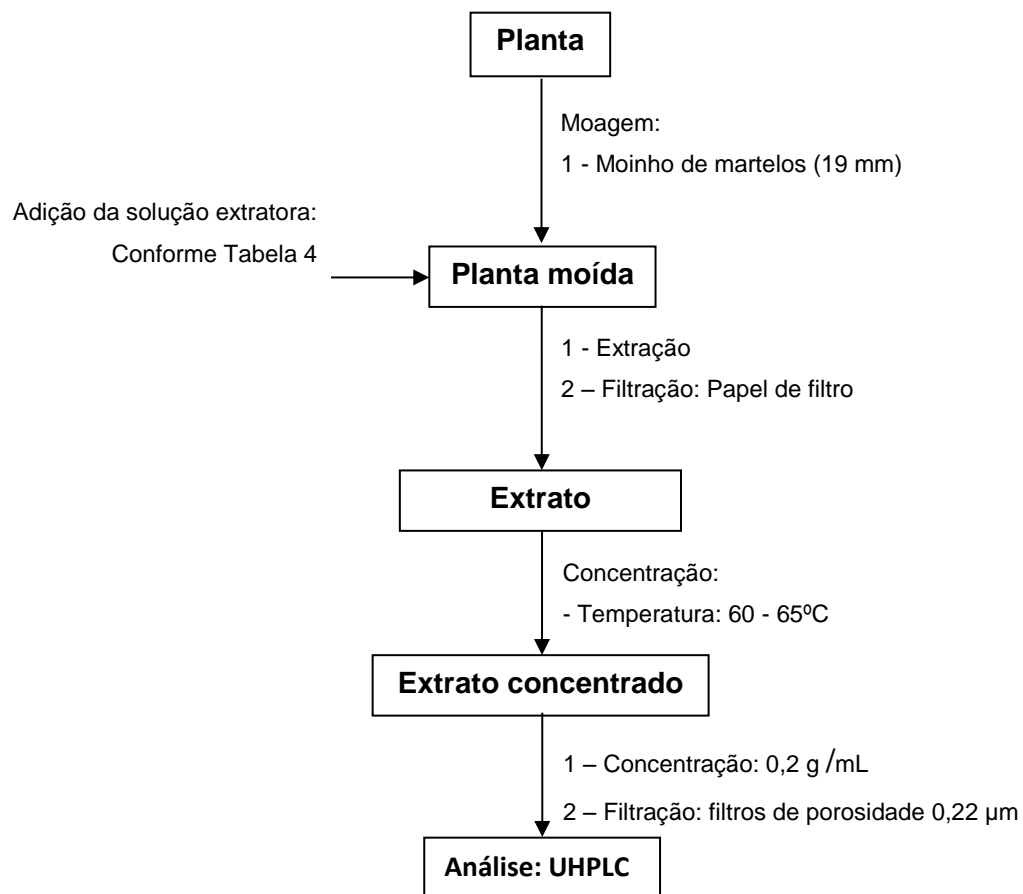
### 4.3 Otimização do processo de extração do Café Verde

O processo de extração foi construído utilizando um planejamento experimental tipo Doehlert (Funari et al., 2016). As variáveis testadas foram razão solvente/planta (X1), tempo (X2), temperatura (X3) e solvente (X4) e foram avaliadas as respostas de cafeína (Y1) e ácido clorogênico (Y2), conforme descrito na Tabela 4. Para a construção do planejamento experimental, comparou-se com o processo extrativo de um extrato de café verde já produzido e comercializado, descrito na Tabela 4, com denominação 22.

Cerca de 15g do material vegetal preparado conforme o item 4.2 foram acondicionadas em frascos de vidros. Em seguida, diferentes volumes e proporções de etanol e água foram adicionados aos frascos, que foi levado ao agitador magnético com aquecimento, permanecendo sob maceração dinâmica por diferentes tempos e diferentes temperaturas, conforme planejamento experimental Doehlert mostrado na Tabela 4.

Cada extrato foi filtrado com papel de filtro e em seguida concentrado com o auxílio de um evaporador rotativo sob pressão reduzida e, com temperatura de 60 – 65°C, até se obter o volume que corresponderia a uma razão inicial material vegetal: solvente 1:4. Em seguida, transferiu-se uma massa de aproximadamente 5 g de cada extrato para balão volumétrico de 25 mL, completando-se este volume com água ultra pura. As soluções foram filtradas em filtros de porosidade 0,22 µm (Millex) e injetadas no sistema UHPLC-PAD/UV, conforme o fluxograma abaixo:





**Figura 4:** Fluxograma do processo de extração referente a otimização dos grãos de café verde.

**Tabela 4.** Planejamento Experimental do tipo Doehlert com quatro variáveis.

Experimentos	Fatores				Resultados	
	Razão solvente/planta ( $X_1$ ) <sup>a</sup>	Tempo (min) ( $X_2$ ) <sup>a</sup>	Temperatura (°C) ( $X_3$ ) <sup>a</sup>	Solvente ( $X_4$ ) <sup>a</sup>	Área: Cafeína ( $Y_1$ ) <sup>a</sup>	Área: Ácido Clorogênico ( $Y_2$ ) <sup>a</sup>
1	0 (8)	0 (75)	0 (60)	0 (etanol 40%)	1842581	1789218
2	0 (8)	0 (75)	0 (60)	1 (etanol 70%)	2267590	2060593
3	1 (12)	0 (75)	0 (60)	0,5 (etanol 55%)	1352604	1269136
4	0,33 (9)	1 (120)	0 (60)	0,5 (etanol 55%)	1538024	1449692
5	0,33 (9)	0,25 (87)	1 (80)	0,5 (etanol 55%)	2894579	2951957
6	0 (8)	0 (75)	0 (60)	-1 (etanol 10%)	2204857	2300195
7	-1 (4)	0 (75)	0 (60)	-0,5 (etanol 25%)	2706760	2813780
8	-0,33 (7)	-1 (30)	0 (60)	-0,5 (etanol 25%)	1494590	1450852
9	-0,33 (7)	-0,25 (63)	-1 (40)	-0,5 (etanol 25%)	1628946	1537558
10	-1 (4)	0 (75)	0 (60)	0,5 (etanol 55%)	4062197	3766818
11	-0,33 (7)	-1 (30)	0 (60)	0,5 (etanol 55%)	2401664	2071000
12	-0,33 (7)	-0,25 (63)	-1 (40)	0,5 (etanol 55%)	2113033	1918942

13	1 (12)	0 (75)	0 (60)	-0,5 (etanol 25%)	1531959	1609068
14	0,67 (11)	-1 (30)	0 (60)	0 (etanol 40%)	1129236	923447
15	0,67 (11)	-0,25 (63)	-1 (40)	0 (etanol 40%)	1368236	1280799
16	0,33 (9)	1 (120)	0 (60)	-0,5 (etanol 25%)	1694167	1704157
17	-0,67 (5)	1 (120)	0 (60)	0 (etanol 40%)	3287803	3386235
18	0 (8)	0,75 (110)	-1 (40)	0 (etanol 40%)	2097724	1184644
19	0,33 (9)	0,25 (87)	1 (80)	-0,5 (etanol 25%)	2037153	2120918
20	-0,67 (5)	0,25 (87)	1 (80)	0 (etanol 40%)	3541708	3660873
21	0 (8)	-0,75 (40)	1 (80)	0 (etanol 40%)	2170058	2059237
22 <sup>b</sup>	(5)	(60)	(70)	(etanol 30%)	3454659	3605776

a: Valores reais correspondentes estão indicados entre parêntese.

b: Método de extração de café verde hoje utilizado na empresa.

#### 4.4 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

O método foi desenvolvido usando um sistema UHPLC-PAD/UV (todos os produtos Waters Technologies, Brasil) compreendendo uma bomba quartenária (QSM-R), um amostrador automático, um compartimento de coluna com termostato com pré-aquecedor de eluente e um detector de arranjo de diodos. As separações foram obtidas em uma coluna C18 BEH Waters (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m).

Inicialmente, utilizou-se como referência o método relatado por Castro et al. (2018), com eluente: solução aquosa de ácido acético 2% (v/v) (eluente A) e água e acetonitrila 50:50 (v/v) com 0,5% (v/v) de ácido acético (eluente B). Em seguida, optou-se por desenvolver outra condição, substituindo-se MeCN por MeOH. O método final teve como eluente solução aquosa de ácido acético 2% (v/v) (eluente A) e metanol (eluente B).

As condições de eluição dos gradientes estão representadas na Tabela 5 e as demais condições foram: fluxo de 0,55 mL/min, volume de injeção de 1  $\mu$ L, forno da coluna em 30°C e concentração da amostra de 20 mg/mL, para ambos os métodos.

As curvas analíticas para cafeína e ácido clorogênico (metanol, 0,10 – 1,0 mg/mL) foram obtidas para a quantificação dos teores nos extratos de café verde.

**Tabela 5.** Comparação entre as condições de eluição do artigo Castro et al. (2018) com a condição D.

Artigo Castro et al. (2018)			Condição D		
Tempo (min)	Solução aquosa AcOH 2% (%) A	Água e acetonitrila 50:50 (v/v) com 0,5% (v/v) de AcOH (%) B	Tempo (min)	Solução aquosa AcOH 2% (%) A	MeOH (%) B
0	90	10	0	90	10
1,5	88	12	4,5	80	20
3,5	88	12	9	50	50
4,5	60	40	12	0	100
7,5	60	40	13	90	10
8,5	0	100	17	90	10
9,5	90	10			
11,5	90	10			

#### **4.5 Determinação de Resíduo Seco**

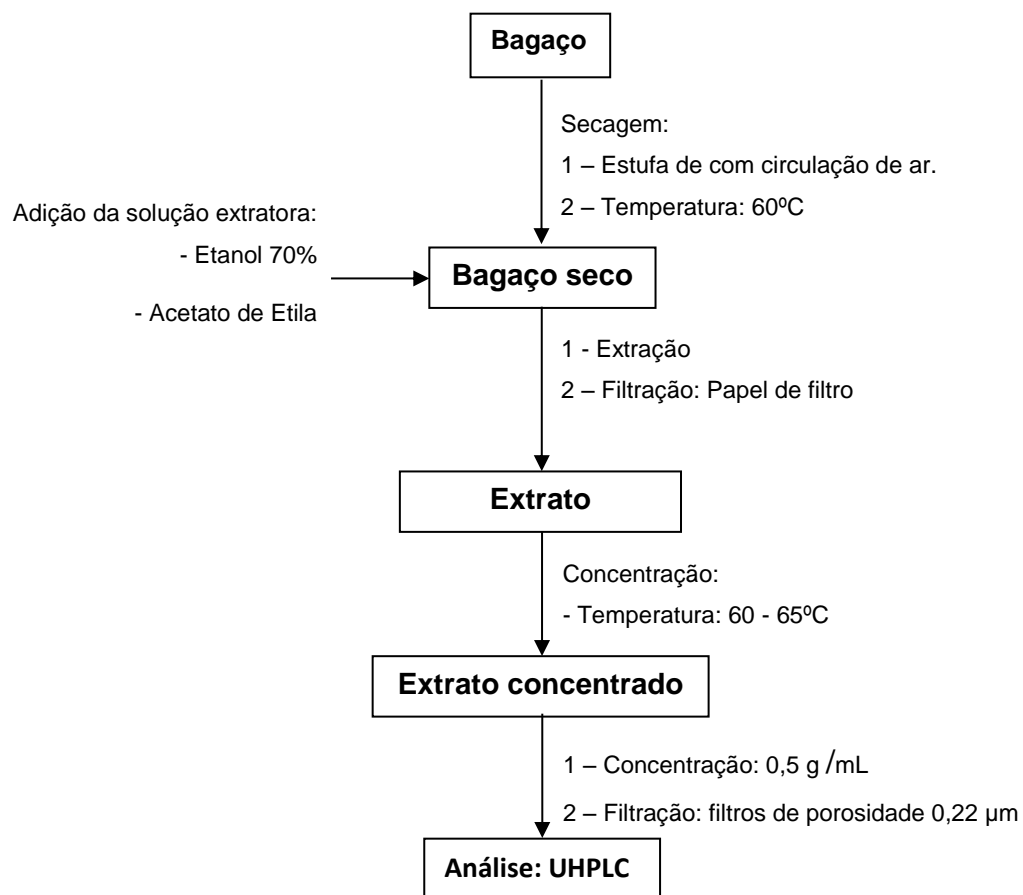
A determinação de peso foi realizada de acordo com o método descrito na Farmacopéia Brasileira, 5ª edição. Pesaram-se cerca de 2 g de amostra em pesa-filtro chato previamente dessecado durante 30 min a 105 - 110°C e tarado. Deixou-se em estufa até se obter o peso constante, retirou-se da estufa e colocou em dessecador por cerca de 30 min. Pesou-se o pesa filtro e calculou os sólidos totais.

#### **4.6 Extração do Bagaço de Café Verde**

Cerca de 60g de resíduo (bagaço) obtido pelos experimentos 10 e 22 (no caso do experimento 22, foi utilizado o bagaço que foi executado em bancada e em escala industrial, ou seja, cerca de 30g de cada processo), foram secos com auxílio de uma estufa com circulação de ar na temperatura de 40°C e com o acompanhamento do conteúdo de umidade ao longo do processo de secagem, pesando as amostras no instante inicial até o peso constante.

Cerca de 15g de cada resíduo seco foram acondicionados em frascos de vidros, e em seguida, 150 mL de solução de etanol 70% foram adicionados aos frascos, e os mesmos foram levados ao agitador magnético com aquecimento, permanecendo sob maceração dinâmica por 2 h. Cada solução extrativa foi filtrada com papel de filtro e em seguida concentrada com o auxílio de um evaporador rotativo sob pressão reduzida e, com temperatura de 60 – 65°C, até se obter a concentração de aproximadamente 0,5 mg/mL. Em seguida, transferiu-se uma massa de aproximadamente 5 g de cada extrato para balão volumétrico de 25 mL, completando-se este volume com água ultra pura. As soluções foram filtradas em filtros de porosidade 0,22 µm (Millex) e injetadas no sistema UHPLC-PAD/UV.

Para efeito de comparação foi realizado a extração com acetado de etila utilizando as mesmas condições descritas acima, e também foi concentrado até se obter a concentração de aproximadamente 0,5 mg/mL, conforme o fluxograma abaixo:



**Figura 5:** Fluxograma do processo de extração do bagaço dos grãos de café verde, proveniente dos experimentos 10 e 22.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

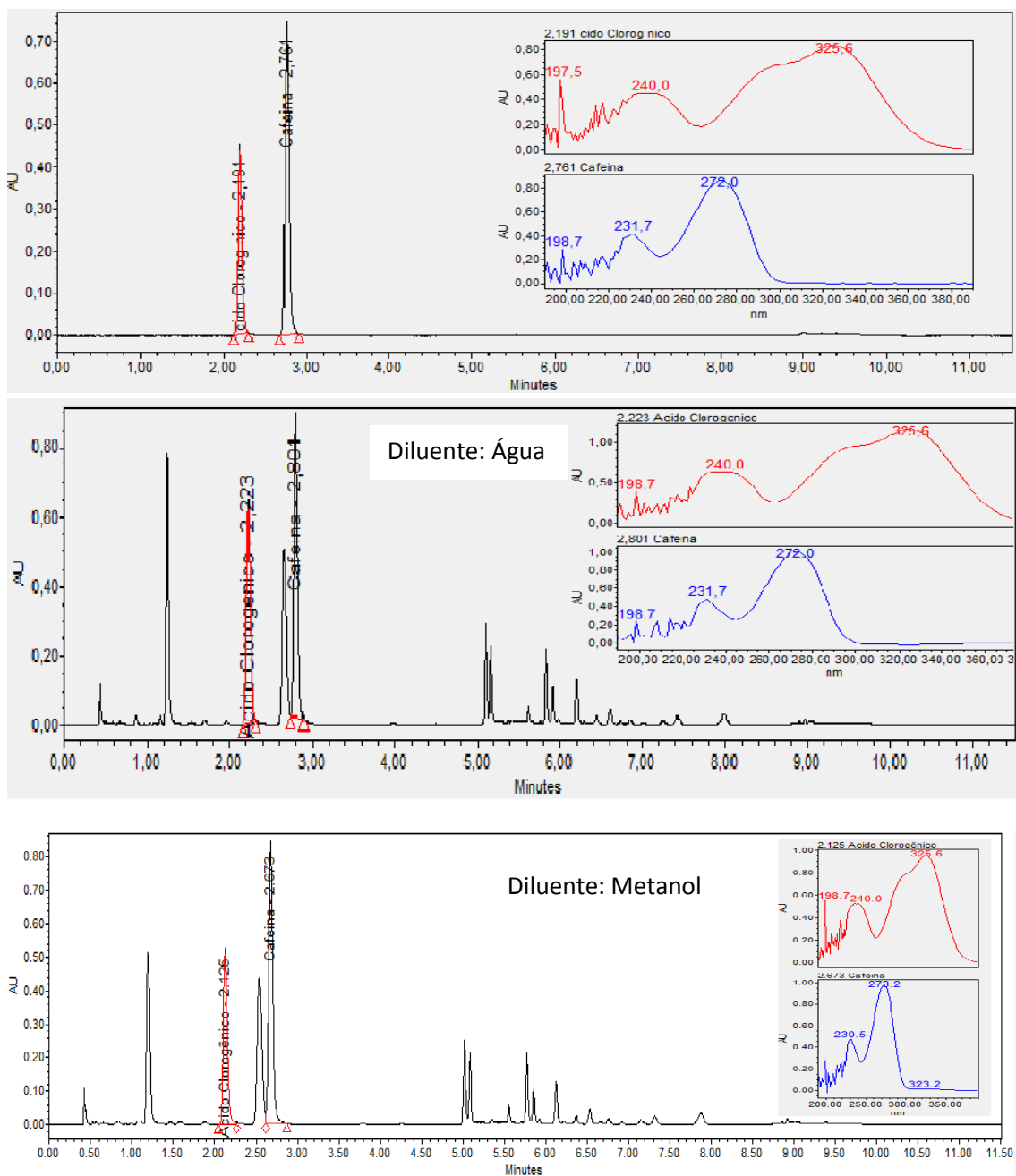
### 5.1 Desenvolvimento da Condição Analítica

Primeiramente foi realizada uma pesquisa na literatura científica sobre os métodos analíticos usados para quantificar os teores de cafeína e ácido clorogênico utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência. Adotou-se como referência o método analítico relatado por Castro et al. (2018), o qual está descrito no item 4.4. Este foi reproduzido com uma pequena alteração: ao invés de uma coluna cromatográfica HSS C18 SB Waters (2,1 x 100 mm; 1,8  $\mu\text{m}$ ), empregou-se C18 BEH Waters (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ), ambas as colunas são de fase reversa, mas possuem hidrofobicidade, seletividade e tamanho de partículas diferentes. Esses parâmetros podem alterar tempo de retenção dos compostos, visto que a hidrofobicidade e a seletividade estão associadas com a polaridade dos compostos. Para a coluna BEH foi possível observar que o tempo de retenção para a cafeína e para o ácido clorogênico foram menores que o tempo de retenção relatado por Castro et al. (2018). Isso pode ser explicado pela polaridade das colunas, uma vez que a BEH é menos apolar que a HSS, e assim, para a BEH os compostos de cafeína e ácido clorogênico ficaram menos retidos, e na coluna HSS ficaram mais retidos.

Para a reprodução do método analítico do artigo, utilizou-se um extrato de café verde já comercializado pela empresa Centroflora Nutra, com teores de cafeína e ácido clorogênico conhecidos, na concentração de 20 mg/mL e solubilizou-se a amostra em dois diluentes, metanol e água, para verificar qual dos dois seria o mais indicado para a solubilização desse extrato, o qual por ser comercializado, já possui um valor médio para as áreas de cafeína e ácido clorogênico, sendo importante para comparar com os resultados obtidos com esses diluentes, já que a condição analítica está sendo desenvolvida.

Para a identificação dos picos cromatográficos de interesse, basearam-se no espectro de UV e no tempo de retenção dos padrões analíticos, e assim, as médias das áreas de ácido clorogênico (5-CQA) e cafeína no extrato de café verde foram de 1870785 e 2803343, respectivamente para o extrato que foi diluído com água, e para o extrato de café verde preparado com metanol,

obteve-se área média de 1708148 para o ácido clorogênico e de 2757674 de cafeína, como pode ser observado na Figura 6.



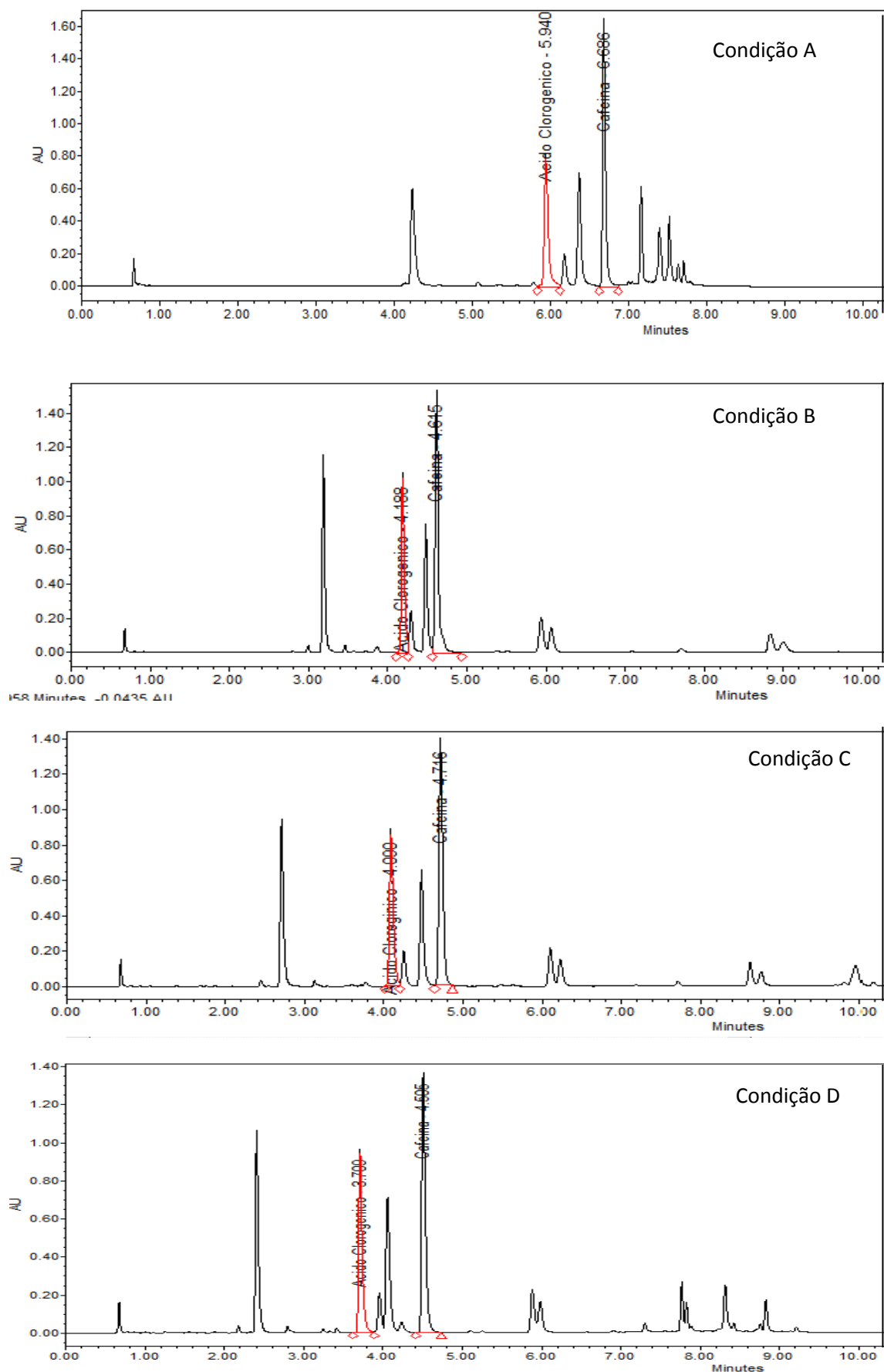
**Figura 6.** Cromatograma UHPLC-UV dos padrões de cafeína e ácido clorogênico (cromatograma superior) e do extrato de café verde comercializado da Centroflora, diluído com água e metanol, visualizado a 280 nm. As condições cromatográficas foram aquelas descritas por Castro et al. (2018): fase estacionária: C18 BEH Waters (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m). Componentes da fase móvel: 2,0% (v/v) AcOH em H<sub>2</sub>O e 0,5% AcOH em H<sub>2</sub>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 1 $\mu$ L. Concentração da Amostra: 20 mg/mL.



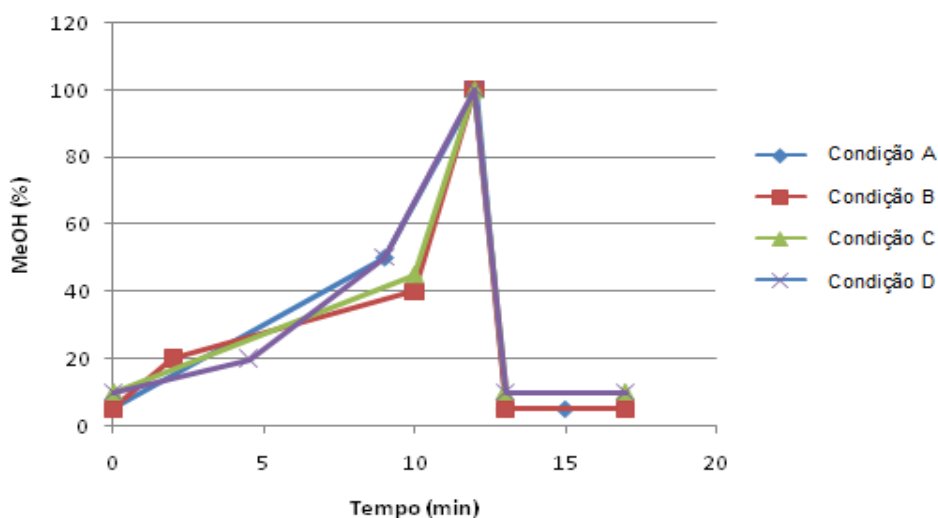
O tempo de retenção e as áreas obtidas para os dois diluentes são semelhantes, e por isso, optou-se em usar água como diluente para as amostras provenientes dos 22 experimentos da Tabela 4.

Sendo a acetonitrila um solvente indesejável do ponto de vista da química verde, optou-se por se desenvolver um novo método UHPLC-PDA/UV, mas substituindo-se a acetonitrila pelo metanol, classificado como recomendado (Prat et al., 2016).

Inicialmente, a força da fase móvel B foi mantida, com o auxílio de um nomograma para cromatografia líquida em fase reversa (C18) (SNYDER, GLAJCH e KIRKLAND, 1997). Os cromatogramas resultantes e as condições testadas podem ser vistas nas Figura 7. Os gradientes usados nas condições estão representados na Figura 8, na forma de um gráfico, e na Tabela 6.



**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.



**Figura 8.** Comparação do gradiente as condições analíticas em relação à concentração de metanol.

**Tabela 6.** Comparação entre os gradientes das condições analíticas A, B, C e D.

Condição A		Condição B		Condição C		Condição D	
Tempo (min)	MeOH (%) B	Tempo (min)	MeOH (%) B	Tempo (min)	MeOH (%) B	Tempo (min)	MeOH (%) B
0	5	0	5	0	10	0	10
9	50	2	20	10	45	4,5	20
12	100	10	40	12	100	9	50
13	5	12	100	13	10	12	100
15	5	13	5	17	10	13	10
		17	5			17	10

As quatro condições cromatográficas discutidas foram executadas com a amostra do extrato de café verde da Centriflora Nutra e foram denominados como A, B, C e D (Tabela 6). Para todas as condições, as áreas sob os picos cromatográficos referentes à cafeína e ácido clorogênico foram medidas. Adicionalmente, as resoluções ( $R_s$ ) entre os picos de cada um destes componentes e daquele mais próximo (resolução do par crítico) foram medidas de acordo com a Equação 1. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

$$R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{Wb_1 + Wb_2} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,  $tr_1$  e  $tr_2$  são os tempos de retenção de dois picos adjacentes e  $Wb_1$  e  $Wb_2$  são as respectivas larguras dos picos na linha de base.

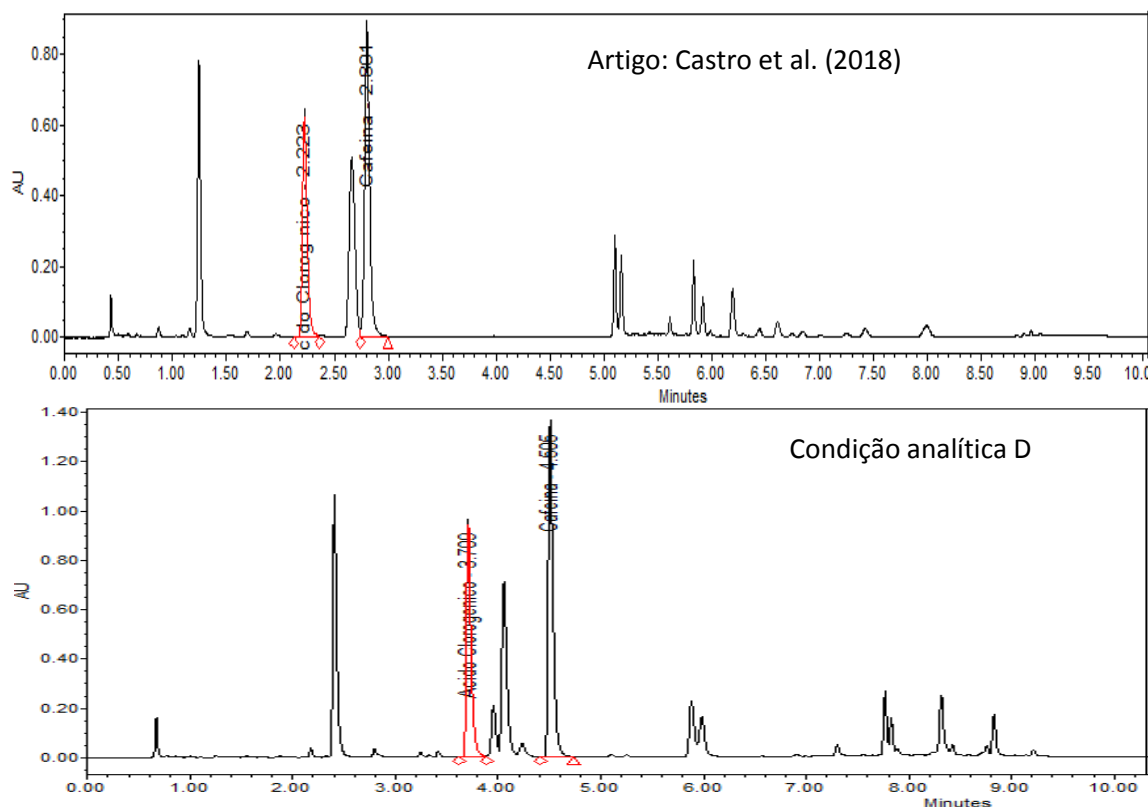
É importante dizer que para que uma quantificação confiável seja realizada, para o par crítico deve-se ter  $R_s \geq 1,5$  (SNYDER, GLAJCH e KIRKLAND, 1997).

**Tabela 7.** Resultados das áreas de cafeína e ácido clorogênico obtidas para as condições analíticas e a resolução entre os picos ( $R_s$ ) do par crítico (pico de interesse com o pico anterior).

<b>Condição Analítica</b>	<b>Área da Cafeína</b>	<b>Área do Ácido Clorogênico</b>	<b><math>R_s</math> crítica para: Cafeína</b>	<b><math>R_s</math> crítica para: Ácido Clorogênico</b>
Castro et al. (2018):diluído com metanol	2803343	1870785	1,30	-
Castro et al. (2018):diluído com água	2757674	1708148	1,40	-
A	4302968	2663944	2,50	2,18
B	4594697	2796098	1,52	1,10
C	4439291	2859635	1,86	1,54
D	4538639	3091122	2,70	2,30

Ao analisar os dados da Tabela 7, percebe-se a semelhança entre as áreas de cafeína e ácido clorogênico para as condições A, B, C e D. No entanto, as melhores resoluções são as do método A e D, com o tempo de retenção dos picos de interesse do método D menor que o do método A. Outro ponto observado, para o método D é que nos primeiros 5 min de análise contém uma concentração de metanol quase constante de 10 – 20% e os picos referentes à cafeína e ácido clorogênico são eluídos nessas condições (Tabela 6, Figura 7). Já no método A, nos primeiros 9 min ocorre um aumento na concentração de metanol de 5 – 50% e os picos de cafeína e ácido clorogênico são eluídos entre 6 e 7 minutos (Figura 7). Como o objetivo do trabalho foi desenvolver uma condição analítica verde, o método D foi o escolhido para dar seguimento nos experimentos apresentados na Tabela 4, visto que o tempo de análise ainda pode ser reduzido e a quantidade de metanol consumida no método D é inferior à de A.

Ao comparar-se o método D com o artigo de Castro et al. (2018), observa-se uma melhor separação dos picos cromatográficos, da cafeína e do ácido clorogênico, devido a alteração do eluente B para metanol, e alteração no tempo de retenção dos picos cromatográficos de interesse, como pode ser observado na Figura 9.



**Figura 9.** Comparação entre os cromatogramas 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.

Outro ponto, é que para o método D, a resolução do par crítico da cafeína é maior que o do artigo de Castro et al. (2018) (Tabela 7), ou seja, ocorre uma melhor separação dos compostos. Ao observar o cromatograma da Figura 9 (cromatograma referente a reprodução do artigo Castro et al. (2018)), percebe-se que o ácido clorogênico não tem par crítico (não tem pico cromatográfico ao lado do seu pico), ou seja, não tem sobreposição entre os picos, e assim, a resolução é maior que 1,5 e não é necessário calcular o  $R_s$  para esse composto.

Assim, pode-se afirmar que a condição D apresentou algumas vantagens em relação às condições que também foram desenvolvidas e ao método do artigo de Castro et al. (2018). As condições cromatográficas da condição D estão representadas na seção 4.4, Tabela 5.

## 5.2 Processo de Extração das sementes de Café verde

Após o desenvolvimento da condição analítica, iniciou-se o processo de extração das sementes de café verde com o auxílio de um planejamento experimental do tipo Doehlert. As condições experimentais estão descrito na Tabela 4. Optou-se por uma abordagem multivariada a uma abordagem univariada, já que na abordagem univariada apenas uma variável de cada vez é avaliada, exigindo um alto número de experimentos e recursos (como, energia, tempo e reagentes) para obter resultados. Este tipo de planejamento permite modelar a resposta da superfície e sua curvatura usando um menor número de experimentos, ou seja, é uma abordagem de economia de recursos para fins de otimização (NOVAES; YAMAKI; DE PAULA; DO NASCIMENTO JÚNIOR; BARRETO; VALASQUES, 2017).

A partir dos experimentos executados (Tabela 4) e das respostas obtidas, buscou-se um modelo matemático que pudesse explicar o processo de separação em função dos fatores testados. Contudo, não foi possível ajustar o modelo. No entanto, foi possível observar que as variáveis X1 e X3 (razão solvente/planta e temperatura) apareceram como significativas, sem os termos quadráticos ou interações, mas com um ajuste de 0,674 para cafeína e 0,698 para o ácido clorogênico, como pode ser visto nas equações 2 e 3:

$$y_1 = 2,16 \cdot 10^6 - 9,91 \cdot 10^5 x_1 + 4,27 \cdot 10^5 x_3 \quad (\text{Equação 2})$$

$$y_2 = 2,06 \cdot 10^6 - 9,78 \cdot 10^5 x_1 + 6,06 \cdot 10^5 x_3 \quad (\text{Equação 3})$$

Ao observar a Tabela 4 é possível verificar que os experimentos 10, 17 e 20 obtiveram uma maior área de cafeína e de ácido clorogênico. No entanto, para os experimentos 17 e 20, pode-se notar uma semelhança nos parâmetros de extração, com alteração apenas no tempo e na temperatura, enquanto que o experimento 17 utilizou-se tempo de 120 min e temperatura de 60°C. No experimento 20, utilizou-se tempo de 87 min e temperatura de 80°C. Assim, pode-se presumir, pela análise empírica, que a temperatura mais alta e menor tempo foi melhor para extração dos compostos de interesse, ou seja, o experimento 20 foi mais eficiente nos parâmetros avaliados do que o experimento 17. Também, pela análise dos dados da Tabela 4, pode-se

observar que ambos têm em comum a variável  $x_1$  em nível negativo e todas as demais variáveis em nível zero ou positivo, indicando assim, que o ideal seria trabalhar com os níveis mais baixos da variável  $x_1$  e as demais variáveis em nível alto. Essa observação, também pode ser notada no experimento 10, em que a variável  $x_1$  está em nível negativo e as demais em nível positivo, indicando assim, uma relação entre os valores dos níveis. No entanto, os parâmetros utilizados nos experimento 10 e 20 são divergentes, apenas com uma semelhança entre os tempos de extração: enquanto que em 10, o tempo é de 75 min, em 20 é de 87 min. Ou seja, os tempos estão relativamente próximos, mas os demais parâmetros não. O experimento 10 possui o menor valor para o nível  $x_1$ , que é a relação de solvente/planta de 4, podendo ser um dos motivos dessa maior eficiência na extração do ativo. E por isso, pode-se presumir que o ponto ótimo deva estar muito próximo do experimento 10. Também foi observado que, em todos os experimentos, as respostas  $y_1$  e  $y_2$  (áreas dos picos de cafeína e ácido clorogênico, respectivamente) estão altamente relacionadas, ou seja, que as melhores condições para a extração de cafeína também o são para o ácido clorogênico.

A falta de ajuste do modelo poderia ter sido provocada, pelo menos em partes, pelos erros experimentais associados às etapas de concentração dos extratos obtidos, até se obter o volume que corresponderia a uma razão inicial matéria-prima:solvente 1:4, conforme descrito no item 4.3. Assim, pode ter ocorrido degradação dos marcadores, devido à temperatura de evaporação, pois, sabe-se que o ácido clorogênico é sensível a altas temperaturas. Entretanto, como os valores obtidos de área de cafeína e do ácido clorogênico do experimento 10 foram superiores ao do experimento 22, optou-se por replicar estas duas condições de extração para compara-las estatisticamente. Foram medidos os sólidos totais de cada novo experimento, diluindo-se o extrato final obtido pelo experimento 22 para ficar com a mesma concentração do experimento 10, ou seja, cerca de 51,3 mg/mL, e realizou-se a análise de teor de cafeína e de ácido clorogênico, conforme descrito no item 4.4. Os filtrados foram concentrados, conforme as condições descritas no item 4.3, até a concentração de 113 mg/g e 112 mg/g, para os experimentos 10 e 22, respectivamente. Os resultados de teores e sólidos totais para os experimentos 10 e 22, estão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

**Tabela 8.** Dados referentes aos sólidos totais e teores de cafeína e ácido clorogênico proveniente das extrações do experimento 10 e 22.

Experimentos	Quantidade de drenado (g)	Sólidos Totais (%)	Teor Cafeína (%)	Teor em base seca de Cafeína (%)	Teor Ácido Clorogênico (%)	Teor em base seca de Ácido Clorogênico (%)
10.1	34,8	5,2	0,61	11,8	0,88	16,9
10.2	35,8	5,1	0,60	11,7	0,86	16,8
10.3	35,7	5,2	0,59	11,3	0,84	16,2
10.4	35,4	5,2	0,60	11,6	0,89	17,1
10.5	35,3	5,2	0,59	11,4	0,88	16,8
<b>Média/DP</b>	<b>35,4</b>	<b>5,2±0,05</b>	<b>0,60±0,01</b>	<b>11,6±0,2</b>	<b>0,87±0,02</b>	<b>16,8±0,34</b>
22.1	46,4	5,3	0,46	8,8	0,71	13,6
22.2	45,8	5,2	0,46	8,8	0,72	13,6
22.3	46,3	5,3	0,47	8,9	0,72	13,6
22.4	47,0	5,2	0,47	9,1	0,73	14,0
22.5	47,0	5,3	0,48	9,1	0,75	14,1
<b>Média/DP</b>	<b>46,5</b>	<b>5,3±0,05</b>	<b>0,47±0,008</b>	<b>8,9±0,15</b>	<b>0,73±0,015</b>	<b>13,8±0,25</b>



**Tabela 9.** Dados referentes aos sólidos totais e teores de cafeína e ácido clorogênico proveniente dos concentrados obtidos pelos experimentos 10 e 22.

Experimentos	Sólidos Totais (%)	Teor Cafeína (%) <sup>b</sup>	Teor em base seca de Cafeína (%)	Teor Ácido Clorogênico (%)	Teor em base seca de Ácido Clorogênico (%)
10	11,3	1,21	10,71	1,73	15,31
22	11,2	0,90	8,03	1,36	12,14

Para efeito de comparação transformou-se os teores de base líquida em base seca, como pode ser observado na Tabela 8, para que a comparação fosse feita na mesma base. Foi possível observar um valor médio de cafeína 11,6% e de 16,8% de ácido clorogênico para o experimento 10 e um valor médio de cafeína 8,9% e de 13,8% de ácido clorogênico para o experimento 22. Assim, é possível observar que o experimento 10 conseguiu extrair uma maior quantidade de ambos os metabólitos de interesse.

Ao avaliar os dados das Tabelas 8 e 9, pode-se observar que houve perda de 8% de teor de cafeína e 9% de ácido clorogênico para o experimento 10 e perda de 10 e 12%, de cafeína e ácido clorogênico, para o experimento 22. Esse dado é muito importante para entender o porquê não foi possível ajustar o modelo, visto que, na realização dos primeiros experimentos foi realizada a concentração dos filtrados, e depois os mesmos foram analisados, e como uma das hipóteses geradas após avaliação dos resultados, era que a concentração poderia ter ocasionado a degradação dos ativos, e por isso, para a reprodução desses novos experimentos não utilizou a concentração dos filtrados, mas sim, a diluição dos mesmos, para que fosse possível avaliar as possíveis perdas e entender os resultados obtidos para esse planejamento experimental. Assim, pelos dados acima, presume-se que a concentração dos extratos ocasionou a degradação dos ativos, e que foi devido a isso, que não foi possível ajustar o modelo.

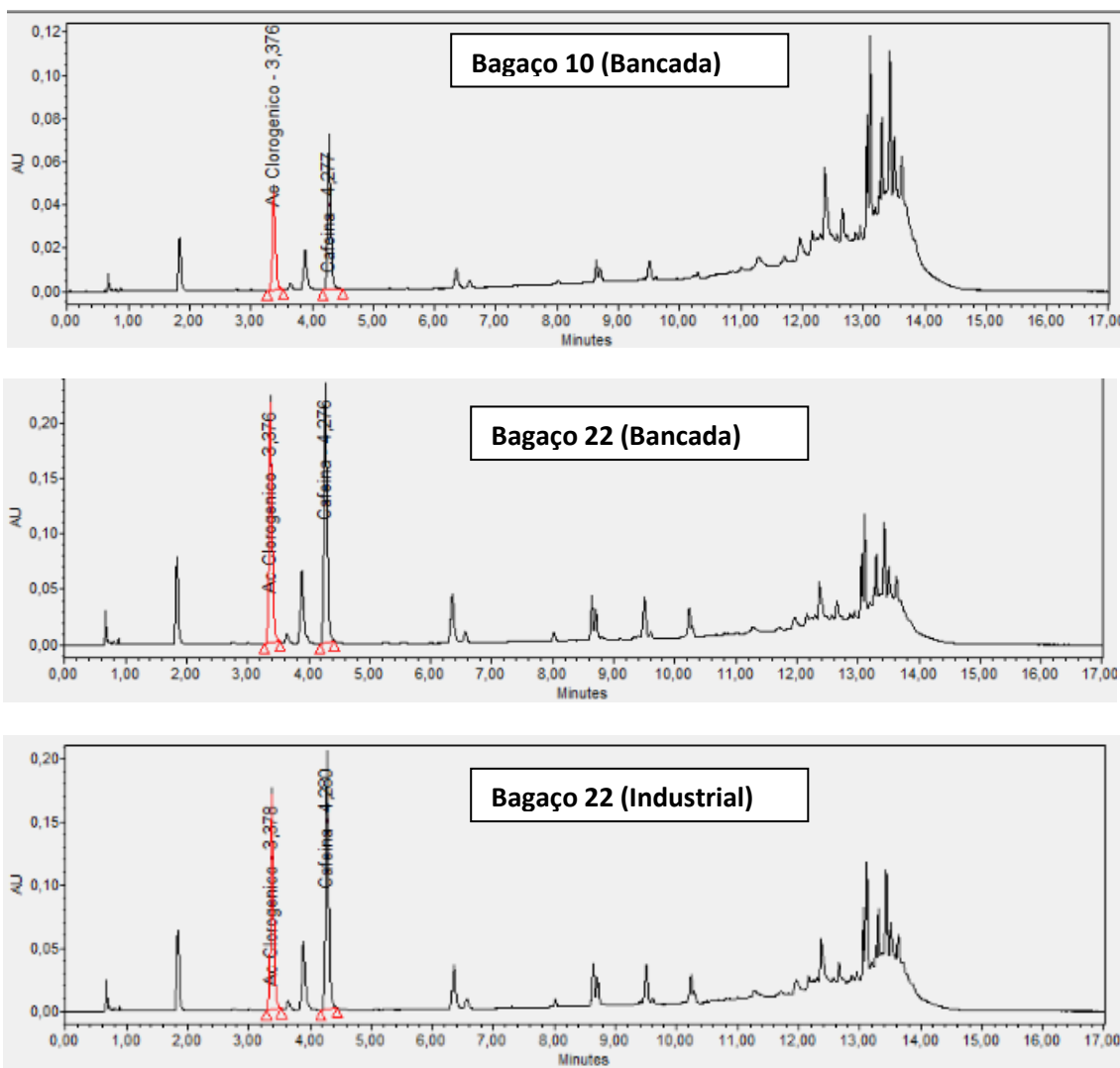
Para verificar se realmente as condições do experimento 10 levaram a uma extração mais eficiente em relação àquelas do experimento 22, os resultados obtidos em quintuplicata com ambas as condições (Tabela 8) foram comparados estatisticamente. Para isso, foram realizados os cálculos do teste t

de *Student* para duas amostras, presumindo-se variâncias equivalentes, e partindo de duas hipóteses, a  $H_0$  de que as médias fossem iguais ( $\mu_{10} = \mu_{22}$ ) e a hipótese  $H_1$  ( $\mu_{10} \neq \mu_{22}$ ), a qual presume que as médias são diferentes. Pelos resultados obtidos, foi possível rejeitar a hipótese nula, ou seja, que as médias de ácido clorogênico e cafeína são iguais, já que  $T_{\text{calc}}(8,23) > T_{\text{tab}}(2,31)$  para o ácido clorogênico e para a cafeína,  $T_{\text{calc}}(15,2) > T_{\text{tab}}(2,31)$ .

Portanto, pode-se concluir que as médias de cafeína e ácido clorogênico são diferentes para os experimentos 10 e 22, com um nível de confiança de 95%, e que os dois métodos de extração de fato extraem quantidades diferentes dos dois metabólitos alvos, ou seja, o experimento 10 mostrou ser mais eficiente para extração do que o experimento 22.

### 5.3 Análise do Bagaço de Café Verde

O próximo passo foi analisar o bagaço obtido pelos experimentos 10 e 22 (no caso do experimento 22, foi utilizado o bagaço obtido em bancada e em escala industrial) para identificar possíveis aplicações, visto que esse material não é reutilizado pela empresa após o processo extrativo. Os bagaços foram preparados conforme descrito no item 4.6, utilizando etanol 70% como solvente extrator, e injetados no sistema UHPLC-PAD/UV utilizando a condição analítica do método D (Tabela 4). Os cromatogramas provenientes desses extratos estão representados na Figura 10.



**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.

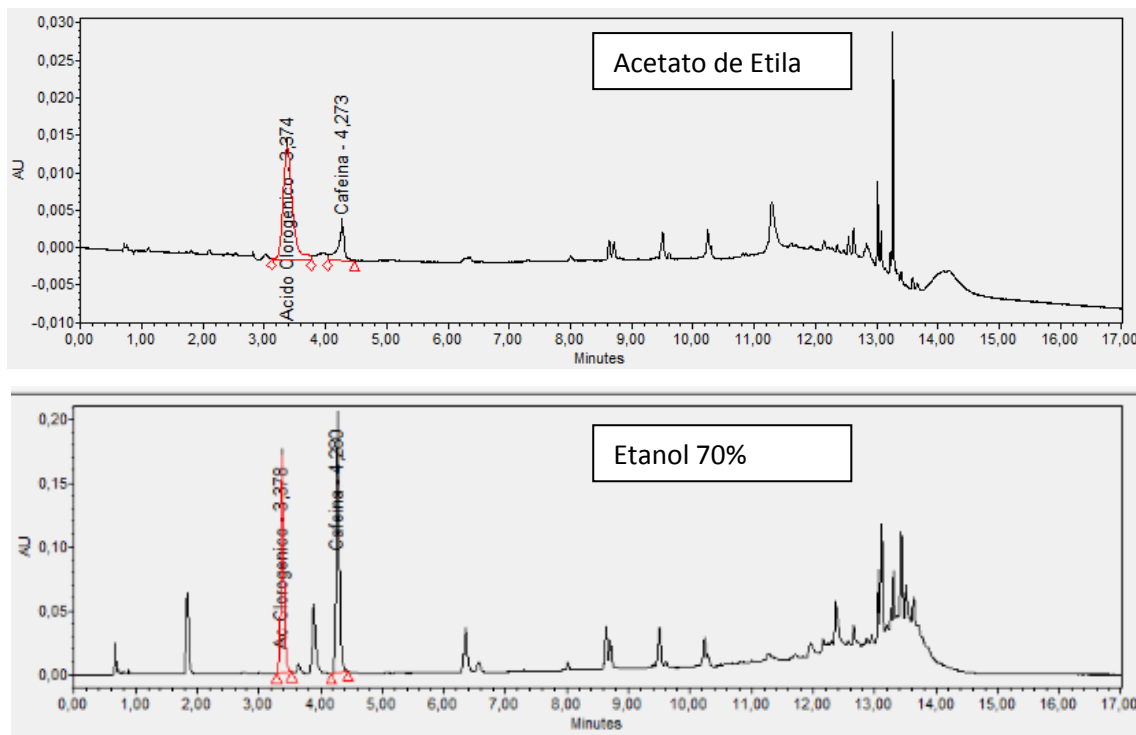
Ao observar os cromatogramas (Figura 10), percebe-se que o perfil químico qualitativo obtido para os três extratos são semelhantes, e que com a análise de UHPLC-PDA/UV foi possível identificar cafeína e ácido clorogênico. Ainda, que, como a concentração das amostras são as mesmas, aproximadamente 0,5 mg/mL, percebe-se que o bagaço do experimento 10 contém uma menor área para os dois compostos de interesse do que o experimento 22, conforme o esperado, já que as condições do experimento 10 mostraram-se mais eficientes para extraí-los.

Foi realizada a mesma extração descrita no item 4.6 para a mesma amostra de bagaço do experimento 22 (escala industrial), mas utilizando acetato de etila como líquido extrator. Os dados referentes aos resultados obtidos estão representados na Tabela 10.

**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.

Extratos (bagaço industrial)	Quantidade de Drenado (g)	Sólidos Totais (mg/mL)	Quantidade em base seca (g)	Área de Cafeína	Área de Ácido Clorogênico	Rendimento (%)
Etanol 70%	110,0	0,20	0,22	632121	467006	1,47
Acetato de Etila	126,55	0,086	0,11	34548	164022	0,73

Ao analisar os dados apresentados na Tabela 10, é possível notar que o rendimento da extração com etanol 70% foi superior ao de acetato de etila, e também, que as áreas obtidas de cafeína e de ácido clorogênico são maiores, indicando que a extração que utilizou como líquido extrator o etanol 70%, extraiu uma quantidade maior de ativo do que a do experimento que foi extraído com acetato de etila. Os cromatogramas referentes a esses extratos estão representados na Figura 11.



**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.

Na Figura 11, referente à comparação entre os cromatogramas obtidos pela extração do bagaço com etanol 70% e de acetato de etila, pode-se também observar, a semelhança entre alguns picos cromatográficos obtidos pelas duas amostras, principalmente os picos após os 9 min.

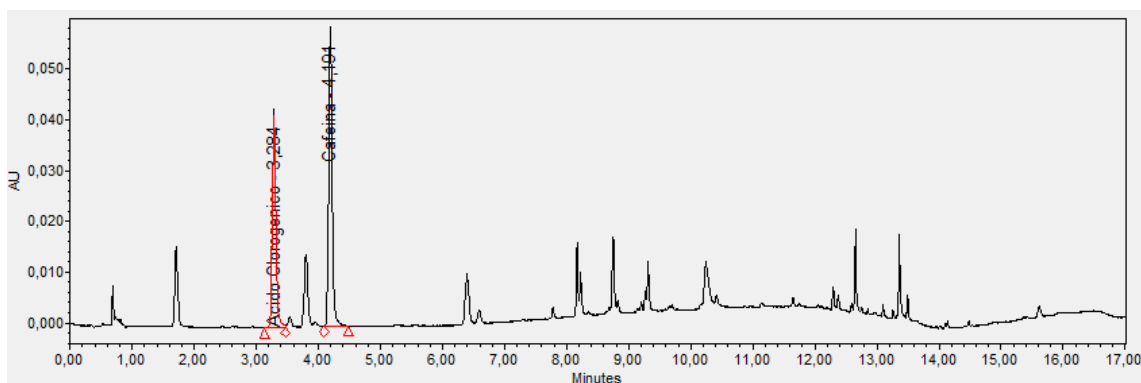
No entanto, ao avaliar o cromatograma proveniente do bagaço industrial extraído com etanol 70% e o extraído com acetato de etila (Figura 11) foi evidenciado que seria necessário alterar o gradiente do método D para ocorrer uma melhor separação dos picos que estavam após o tempo de 12 min para obter um melhor resultado na análise realizada pelo UHPLC-PDA/UV, e assim, foi necessário desenvolver um método mais apolar, mas sem alterar a polaridade inicial do método D, para que não houvesse diferença na eluição dos picos de cafeína e do ácido clorogênico. O novo gradiente utilizado, as condições cromatográficas e o cromatograma obtido estão representados na Tabela 11 e na Figura 12, respectivamente.

Fase Estacionária: C18 BEH Waters (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)

- Eluente:
  - Eluente A: 2% (v/v) ácido acético em água
  - Eluente B: Metanol
- Fluxo: 0,35 mL/min
- Volume de injeção: 1 µL
- Temperatura do forno da coluna: 30°C
- Gradiente:

**Tabela 11.** Gradiente referente às proporções das fases móveis A e B do método desenvolvido para melhor separação dos picos após 12 min.

Tempo (min)	Solução aquosa AcOH 2% (%) A	MeOH (%) B
0	90	10
4,50	80	20
15,00	0	100
17,00	90	10



**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.

Pela análise do cromatograma referente ao bagaço proveniente do experimento 22 (Figura12), com alteração do gradiente, foi possível observar que não houve alteração no tempo de retenção da cafeína e do ácido clorogênico, apenas uma melhor distribuição dos picos cromatográficos após o tempo de 12 min, sendo fundamental para a identificação dos mesmos.

No entanto, foi possível identificar, utilizando UHPLC-PDA/UV, os marcadores de cafeína e ácido clorogênico nas amostras provenientes das extrações de bagaço, indicando assim, que mesmo após as extrações, ainda contêm quantidades de cafeína e ácido clorogênico, podendo assim, utilizar o bagaço para gerar um novo extrato de café verde, o qual teria um teor menor desses marcadores, e como o processo utiliza o bagaço proveniente de um processo que já está implementado na empresa, o custo desse novo extrato seria relativamente baixo, podendo ser aplicado no segmento alimentício. E também durante o levantamento bibliográfico dos componentes do café, foi observado um valor significativo de proteínas e lipídeos (Tabela 2). As análises de quantificação serão realizadas pela empresa Centroflora Nutra, para verificar se esse bagaço pode ser usado para fins alimentícios com alto teor de proteínas e/ou lipídeos.

## 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](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.; ZOCCOLO, 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**. 2<sup>nd</sup>. 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**. 2<sup>nd</sup>. 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.