



CRISTIANE DE OLIVEIRA COSTA

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE
CAFEÍNA EM FOLHAS DE CAFEIEIRO POR HPLC**

**LAVRAS – MG
2021**

CRISTIANE DE OLIVEIRA COSTA

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA EM FOLHAS
DE CAFEIRO POR HPLC**

Monografia apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do curso de
Química para a obtenção do título de Licenciada.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Me. Fabrício Lelis da Silva
Coorientador

LAVRAS – MG

2021

CRISTIANE DE OLIVEIRA COSTA

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA EM FOLHAS
DE CAFEIEIRO POR HPLC**

Monografia apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do curso de
Química para a obtenção do título de Licenciada.

APROVADA em 13 de maio de 2021

Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães - UFLA

Dr. Renan Terassi Pinto - UFLA

Dr. Luciano Vilela Paiva - UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Me. Fabrício Lelis da Silva
Coorientador

LAVRAS – MG

2021

AGRADECIMENTOS

À toda minha família e amigos, todos aqueles que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Ao meu orientador Luciano, pela oportunidade de contribuir para um trabalho maior e de grande importância. Ao meu coorientador Fabrício, e ao técnico de laboratório Ricardo, que sempre estiveram comigo, com muita paciência e me auxiliando em todas as dificuldades, sempre me ensinando muito. À CNPq e ao LCBM pela oportunidade de desenvolver diversos trabalhos e por toda aprendizagem que adquiri ao longo dos anos. A UFLA, DQI e todos os professores que tive durante a graduação, e que de forma direta ou indireta me ajudaram a chegar até aqui. Serei eternamente grata a todos por tudo!

RESUMO

O café é um dos frutos mais consumidos do mundo, por este motivo seus componentes são amplamente estudados em diversas áreas, como agronomia, biologia, engenharia, química, entre outros. Entre seus componentes, a cafeína é o mais conhecido e estudado devido à sua ação estimulante do SNC. Esta propriedade, porém, é acompanhada de efeitos colaterais como insônia e taquicardia, e então, por este motivo, muitas pessoas preferem consumir o café descafeinado. Este trabalho visa buscar um método de extração sensível o bastante para auxiliar pesquisas biotecnológicas cujos objetivos envolvam obtenção de um grão de café com baixo teor de cafeína, para isto, foram selecionados 5 métodos de extração de cafeína utilizando diferentes solventes, água, clorofórmio, óxido de magnésio, hidróxido de sódio e metanol. Após a extração, as amostras e soluções padrão foram analisadas via HPLC, e em seguida a quantificação e os cromatogramas obtidos foram comparados a fim de definir qual seria o melhor método de extração, levando em consideração diversos fatores, como por exemplo quantidade inicial de amostra, toxicidade em relação aos solventes, resolução dos picos e presença de ruídos. Entre os métodos comparados, a extração com metanol obteve o melhor resultado, com um pico bem resolvido, menor quantidade inicial de amostra e menor toxicidade (em relação ao clorofórmio).

Palavras-chave: HPLC; cafeína; extração.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	A cultura do Café (<i>Coffea spp.</i>)	9
2.2	Cafeína	10
2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC	11
2.4	Solventes e compostos utilizados	14
2.4.1	Metanol	14
2.4.2	Água ultrapurificada	14
2.4.3	Clorofórmio	15
2.4.4	Óxido de Magnésio	16
2.4.5	Hidróxido de sódio	16
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	Reagentes	17
3.2	Preparação das amostras	17
3.3	Processo de extração	18
3.3.1	Extração com clorofórmio	18
3.3.2	Extração com óxido de magnésio	18
3.3.3	Extração com água	19
3.3.4	Extração com hidróxido de sódio	19
3.3.5	Extração com metanol	20
3.4	Curva analítica	20
3.5	Processo de análise	20
4.	RESULTADOS	22
4.1	Extração com clorofórmio	22
4.2	Extração com óxido de magnésio	24

4.3	Extração com água	27
4.4	Extração com hidróxido de sódio	29
4.5	Extração com metanol.....	31
4.6	Comparação entre os métodos.....	33
5.	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

O café é largamente cultivado e consumido no Mundo, sendo o Brasil o maior produtor e exportador do grão. O histórico de seu cultivo mescla-se com a história brasileira, dada sua relevância econômica e social. O estado de Minas Gerais é, atualmente, o maior produtor nacional, com destaque para a região Sul do estado. Além disso, recentemente tem ocorrido sua expansão para demais regiões, como o Norte e Noroeste de Minas.

Esta planta é conhecida devido seu efeito estimulante, relacionado à cafeína. Esta molécula está presente em toda a planta de café e é uma substância química classificada como alcaloide do grupo das xantinas, e por essa razão é capaz de excitar ou restaurar as funções cerebrais e bulbares. Apesar de possuir alguns efeitos adversos como taquicardia e insônia, a cafeína conta ainda com alta atividade antioxidante, em razão de seus efeitos metabólicos. Assim, a cafeína, além de consumida por meio do café, possui amplo uso medicamentoso.

Desde a descoberta dos efeitos de seu consumo, vários componentes do café como a trigonelina, ácidos clorogênicos e cafestol são amplamente pesquisados, e também a cafeína, que é o componente mais estudado devido às suas diversas aplicabilidades. O estudo destes extratos presentes nos vegetais, são amplamente utilizados visando entender melhor sua composição e seu metabolismo, e desta forma, auxiliar em diversos estudos, como melhoramento genético e produtivo. Por este motivo, pesquisadores de todo o mundo estudam a cafeína na planta, sejam em seus frutos, raízes, folhas e também em suas células. Para tais estudos, algumas vezes é necessária a extração da cafeína.

Para garantir que toda a cafeína presente na amostra após a extração seja quantificada, é necessário o uso de um equipamento que possua alta resolução e sensibilidade para detectar pequenas quantidades, e alta seletividade e especificidade para separá-lo bem de outros compostos que possam estar presentes no extrato. Apesar de existirem técnicas mais baratas, elas não são tão sensíveis e exatas, por isso a escolha da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, sigla em inglês) que compreende todos estes aspectos necessários, contando com o alto poder de separação e alta sensibilidade na identificação de compostos.

Existem, na literatura, diversos métodos descritos para a determinação de cafeína em amostras farmacêuticas, café, chá, urina e refrigerantes. Neste sentido, este trabalho objetiva comparar, principalmente em função de sensibilidade e eficiência, diferentes metodologias encontradas na literatura, para a extração de cafeína em extratos vegetais, neste caso, em folhas de café frescas e secas. Após a extração, para verificar qual o melhor resultado, foi realizada a aplicação da técnica de cromatografia líquida (HPLC) para identificação e quantificação da

molécula de cafeína.

O experimento visa contemplar uma das linhas de pesquisa do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), onde procura-se obter plantas de café que produza grãos descafeinados ou com pouco teor de cafeína, através de edições gênicas nos genes responsáveis pela síntese dos compostos chaves na rota de síntese da cafeína.

Para confirmar a ocorrência do evento de transgenia é necessária a realização da quantificação da cafeína nas plantas, ainda nas primeiras fases de desenvolvimento *in vitro*. Dessa forma, este trabalho visa comparar e estabelecer o melhor método entre os testados para realizar análises precoces nas plantas provenientes da transformação genética.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do Café (*Coffea spp.*)

O gênero *Coffea* é composto por mais de 100 espécies, com destaque para a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, em razão de suas características comerciais. Estas recebem nome vulgar de café arábica e café robusta, respectivamente (COSTA, 2016).

O Brasil ainda hoje é o maior produtor e exportador de café no mundo, com cerca de 61,6 milhões de sacas beneficiadas na safra 2019/20, sendo 47,4 milhões de café arábica e 14,3 milhões de Conilon. A área cultivada é estimada em 2,16 milhões de hectares, sendo 80% deste total correspondente à cultivos de café arábica (1,76 milhão de ha). Minas Gerais concentra a maior área com a espécie, 1,031 milhão de hectares, correspondendo, nesta safra, a 68% da área ocupada com café arábica em âmbito nacional. Tal estado é o maior produtor nacional, contando com 33,4 milhões de sacas beneficiadas no ano de 2020. A produção para a região do Sul de Minas, a principal do estado, está estimada em 18.216,3 mil sacas (CONAB, 2020).

O café é uma das bebidas mais populares do mundo, chegando ao consumo aproximado de 6,7 milhões de toneladas por ano. Há algum tempo, o seu consumo vem sendo largamente difundido na cultura ocidental, uma constante na dieta alimentar, principalmente, durante os últimos cinco séculos (CAZARIM; UETA, 2014).

Atualmente, o café é consumido quase que em sua totalidade pela infusão dos grãos das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. A bebida é popular em razão de seu efeito estimulante associado à cafeína (DURÁN et al., 2017). Contudo, outros de seus efeitos fisiológicos, relacionados a uma gama de substâncias encontradas na bebida, tem sido alvo de diversos estudos. Dentre estas substâncias destacam-se o cafestol, o caveol, os ácidos clorogênicos e seu composto mais conhecido, a cafeína (CAZARIM; UETA, 2014).

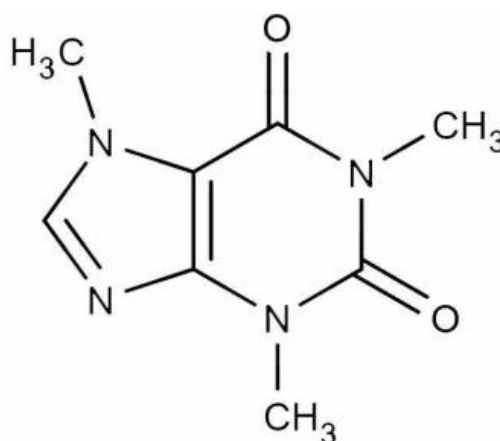
Algumas pessoas possuem intolerância a cafeína ou não gostam dos efeitos que ela causa, e por este motivo investem em café descafeinado. Segundo um relatório publicado na Grand View Research, este é um mercado que foi avaliado em US \$ 1,65 bilhão em 2019 e a previsão é de que deve atingir US \$ 2,8 bilhões em 2027. (GVR, 2020)

A conscientização sobre os efeitos da cafeína pode influenciar este aumento de mercado, porém o processo de descafeinação utiliza solventes tóxicos como cloreto de metileno, e que alteram o sabor. Pesquisas buscam descobrir um grão de café colhido diretamente da planta e que seja sem cafeína para que as propriedades do café e seu complexo sabor sejam preservados. (BORREL, 2012)

2.2 Cafeína

A cafeína é uma substância química de fórmula $C_8H_{10}N_4O_2$, classificado como alcaloide do grupo das xantinas e de nomenclatura 1,3,7-Trimetilpurino-2,6-diona. Está presente em algumas plantas e é utilizada no consumo em bebidas, na forma de infusão, como estimulante. É o composto mais conhecido dentre os presentes no café, contando ainda com alta atividade antioxidante, em razão de seus efeitos metabólicos, resultantes da ação do ácido 1-metilúrico e 1-metilxantina os quais possuem efeito preventivo da oxidação da LDL (SILVA et al., 2018).

Figura 1 - Fórmula estrutural da cafeína (1,3,7-Trimetilpurino-2,6-diona).



Fonte: Do autor (2021).

A cafeína faz parte do grupo das drogas metilxantinas, tal como a teofilina, a teína, a guaraína e a teobromina. As metilxantinas são alcaloides diretamente relacionados que se distinguem por sua potência farmacológica sobre o sistema nervoso central – SNC. Nessa perspectiva, a cafeína é um composto capaz de excitar ou restaurar as funções cerebrais e bulbares, sem, entretanto, ser classificada como uma droga terapêutica, sendo intensamente consumida e livremente comercializada, por contar com uma baixa capacidade de indução à dependência (PASA; PASA, 2017).

De forma geral, seus efeitos sobre o organismo fundamentam-se em intensificar o estado de alerta e diminuir a fadiga, podendo incrementar a capacidade de execução de certas atividades. A cafeína ainda conta com estímulo à diurese, em razão – entre outros mecanismos – ao aumento dos glomérulos em funcionamento e do fluxo sanguíneo renal, ao aumentar os batimentos cardíacos (GUERRA et al., 2000).

De modo análogo as demais xantinas, a cafeína conta com efeitos taquicardizantes, broncodilatadores, estimulantes da secreção gástrica, além de ser capaz de alterar a força de contração do coração. Em maior quantidade, causa excitação, ansiedade e insônia e em indivíduos que consomem frequentemente causa tolerância, levando à necessidade de aumentar o consumo para o alcance dos efeitos iniciais. A interrupção do consumo causa uma síndrome de abstinência com cefaleia, irritabilidade e letargia (GUERRA et al., 2000).

Nas células, a cafeína atua como um antagonista competitivo dos receptores de adenosina e possivelmente ainda atua ao nível de receptores, de modo direto, potencializando a liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático, pelo desacoplamento da atividade da ATPase no músculo esquelético. Como efeito desses mecanismos celulares, a cafeína gera um incremento na lipólise, facilita a transmissão no sistema nervoso central, uma diminuição da concentração plasmática de potássio durante o exercício, um incremento da força de contração muscular em baixas frequências de estimulação e uma redução do consumo do glicogênio muscular (GUERRA et al., 2000).

Por essa razão a cafeína vem sendo empregada frequentemente de modo agudo, anteriormente aos exercícios físicos, com o propósito de retardar a fadiga e, como efeito, melhorar o desempenho em atividades de média e longa duração (MATA et al., 2020).

Além disso, no Brasil a cafeína está presente em diversos medicamentos, como antigripais, analgésicos, antitérmicos e miorrelaxantes. Certos medicamentos indicados para o alívio dos sintomas do resfriado contêm cafeína, com o propósito de diminuir a sonolência gerada pelos anti-histamínicos. Além disso, medicamentos que contêm cafeína podem ser utilizados sem prescrição para aumentar a sensação de bem estar (SILVA, 2017).

Existem na literatura diversos métodos descritos para a determinação de cafeína em amostras farmacêuticas, café, chá, urina e refrigerantes, dentre estes estão a gravimetria, espectrofotometria UV-Vis, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, HPLC, eletroforese capilar, espectroscopia IR e eletroquímica (SILVA, 2017).

2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

A cromatografia emergiu no começo de 1900 quando o botânico russo Mikhail S. Tswett trabalhou na separação de pigmentos extraídos de folhas, conduzindo um solvente por meio de uma coluna cheia de partículas de vidro. Seu trabalho possuía como propósito pesquisar a clorofila e xantofila existente nas plantas. Deste modo, em seu experimento fez percorrer, através da coluna, a amostra que havia preparado – extrato de solvente de folhas de plantas

homogeneizadas, seguindo-se a passagem de um solvente puro. A avaliação dos pigmentos, que passaram através da coluna por meio da força da gravidade, foi realizada por meio da observação das faixas com cores distintas (PORTO, 2014).

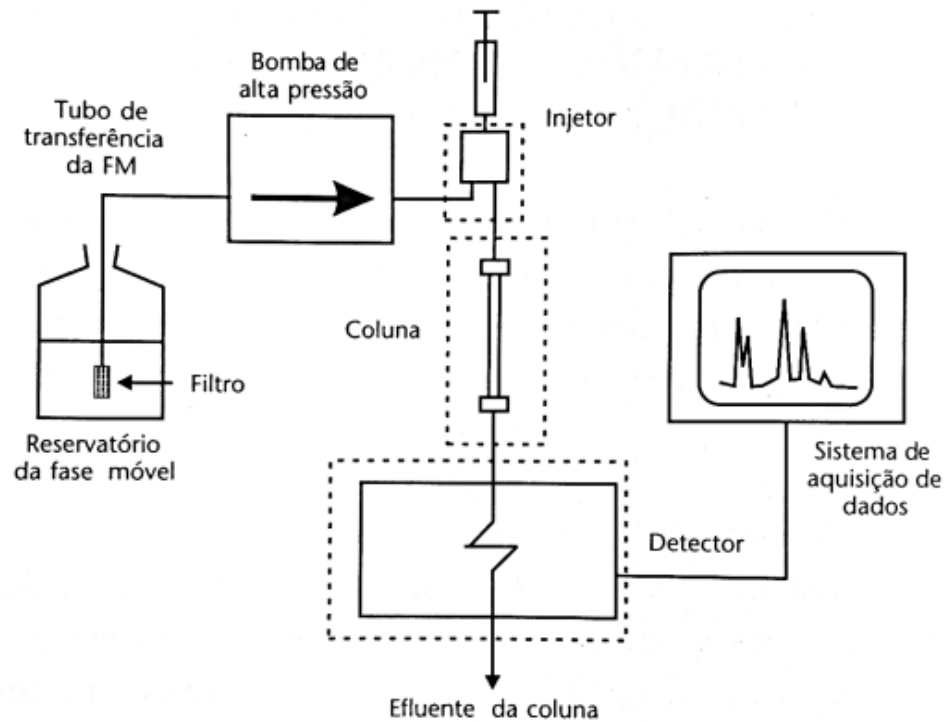
Com tal avaliação, foi possível que S. Tswett identificasse os distintos pigmentos que compunham o extrato homogêneo da folha de uma planta e inferiu que a separação analítica dos mesmos se fundamentava na força da atração química que cada pigmento tinha com a fase estacionária. Para fins de conclusão, os pigmentos que foram intensamente atraídos pelas partículas da coluna possuiriam uma maior afinidade com a fase estacionária e, por consequência, tinham fluxo mais lento pela mesma. Em contrapartida, as partículas que foram mais atraídas pelo solvente e removidas mais rapidamente da coluna possuiriam uma maior afinidade pela fase móvel. Deste modo, cada pigmento percorreu a coluna com uma velocidade distinta, tornando possível uma separação dos pigmentos que puderam ser posteriormente analisados e identificados (PORTO, 2014).

Comumente, vincula-se ao húngaro Csaba Horváth, por volta dos anos de 1970 a sugestão da sigla HPLC (primordialmente com o significado “High Pressure Liquid Chromatography” e, subsequentemente, com o progresso da técnica, “High Performance Liquid Chromatography”) (LANÇAS, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência trata-se de uma técnica analítica de separação de componentes de uma matriz, em que a separação é dependente da distribuição molecular dos componentes da matriz em duas fases, fase móvel, que neste tipo de cromatografia é um líquido, e a fase estacionária, que se trata de uma coluna de separação de aço inox com um tipo de preenchimento poroso (ROCHA, 2015).

O sistema é constituído pelo reservatório de fase móvel; bomba de alta pressão que conduz a fase móvel a um determinado fluxo através da coluna; o injetor da amostra que pode ser tanto de operação automática ou manual; a coluna cromatográfica que pode ser preenchida por diversos materiais (o que dá versatilidade a técnica); o detector que pode ser de vários tipos e o registrador, que é o computador que processa os dados (SILVA, 2019).

Figura 2 – Esquema de um cromatógrafo líquido.



Fonte: Silva (2019).

Na HPLC, a fase estacionária deve ser imiscível com a fase móvel e estas são selecionadas de forma que os constituintes da amostra se distribuam de forma diferenciada. Os analitos que interagem intensamente com a fase estacionária possuem fluxo mais lento na fase móvel e, assim, são eluídos posteriormente aos componentes com interação mais fraca com a fase estacionária. Tal retenção seletiva dos componentes da amostra tem por consequência movimentos distintos dos componentes de interesse, o que possibilita sua identificação (SILVA, 2019).

A HPLC é o tipo de maior versatilidade e intensamente empregado de cromatografia por eluição, utilizado para detectar, quantificar e purificar substâncias em matrizes de amostras distintas, oriundas de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Além disso, possui vantagens em relação às demais metodologias de separação e análise de misturas químicas, tais como: 1) a hipótese de emprego em diversos tipos de amostras; 2) alta precisão e resolução dos resultados obtidos; 3) menor tempo de análise, em comparação a outras técnicas cromatográficas; 4) sensibilidade considerável, em razão do emprego de detectores com maior tecnologia; 5) boa reprodutibilidade (BRAGA, 2018).

Os mecanismos de separação são estritamente dependentes das interações que se dão entre o analito, a fase móvel e a fase estacionária, e podem ocorrer por processos físicos, químicos ou mecânicos. Os principais tipos são: adsorção, troca iônica, partição, exclusão por

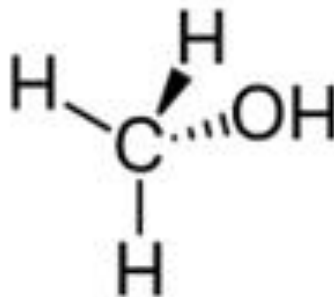
tamanho, afinidade ou interações estereoquímicas, e dependem da natureza química das substâncias que serão separadas, de fatores vinculados à composição e vazão da fase móvel e a composição da fase estacionária (BRAGA, 2018).

2.4 Solventes e compostos utilizados

2.4.1 Metanol

O Metanol (CH_3OH) é um líquido claro, incolor, volátil, de elevada polaridade que possui um odor intrínseco, denominado “espírito da madeira”. Manifesta reações características de álcoois alifáticos. Ainda é conhecido como Carbinol, Hidróxido de Metila, Monohidroximetano, Álcool Metílico e Wood alcohol (LIMA NETO, 2009).

Figura 3 – Estrutura química do metanol.



Fonte: Lima Neto (2009).

A síntese do metanol foi iniciada no fim do século de XIX, sendo isolado de mistura resultante da pirólise da madeira. Os grupos de pesquisa e desenvolvimento, no começo do século XX visavam a conversão de gás de síntese ($\text{CO} + \text{H}_2$) em combustíveis líquidos e produtos químicos. Uma das técnicas mais empregadas era a síntese de Fischer-Tropsch que, por catálise metal/álcali, coproduzia o metanol. Na atualidade o metanol é industrializado em sua grande maioria a partir do gás natural, mediante um processo catalítico de alta atividade e seletividade (LIMA NETO, 2009).

2.4.2 Água ultrapurificada

A água ultrapurificada conta com reduzida concentração de íons, reduzida carga microbiana e reduzidos níveis de carbono orgânico total. Este tipo de água é exigido em usos mais específicos, especialmente em laboratórios de pesquisa, para diluição de substâncias, em controle de qualidade e na limpeza final de equipamentos e utensílios empregados em processos que possuam contato direto com a amostra que exija tal nível de pureza. Este tipo de água é

indicada para metodologias de análise que se faça necessária mínima interferência e máxima precisão e exatidão (ANVISA, 2017).

O emprego de água ultrapurificada em análises quantitativas a níveis de traços de analito é imprescindível para a aquisição de dados analíticos precisos. Outros exemplos de uso da água ultrapurificada são: análises de resíduos, entre eles os traços de elementos minerais, endotoxinas, preparações de calibradores, controles e substância química de referência, etc. Em análises por: espectrometria de absorção atômica em geral, ICP/IOS, ICP/MS, espectrometria de massa, procedimentos enzimáticos, cromatografia a gás, cromatografia a líquido de alta eficiência (determinação de resíduos em ppm ou ppb), metodologias em biologia molecular e com cultivo celular, etc (ANVISA, 2017).

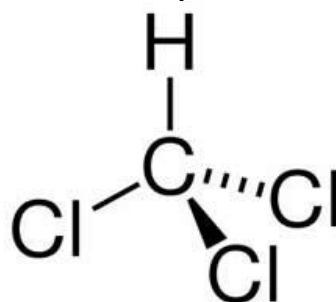
Este tipo de água deve ser empregada no instante em que é obtida, ou no mesmo dia da coleta. O laboratório deve empregar o mesmo de tipo de água exigido para a análise da preparação das amostras, na obtenção das soluções empregadas na construção da curva analítica, no preparo de soluções, brancos de amostras, na limpeza final do material e em toda a vidraria que estará em contato direto com a amostra, sempre que for prudente (ANVISA, 2017).

A água ultrapurificada é caracterizada por condutividade de 0,055 a 0,1 mS/cm a 25,0 °C \pm 0,5 °C (resistividade > 18,0 M Ω .cm), carbono orgânico total (COT) \leq 0,05 mg/L (alguns casos \leq 0,03 mg/L), endotoxinas < 0,03 UE/mL e contagem total de bactérias \leq 10 UFC/100 mL (ANVISA, 2017).

2.4.3 Clorofórmio

O clorofórmio, de fórmula molecular CHCl₃ e peso molecular 119,39, é um líquido claro, volátil e com odor característico, empregado como solvente em vários produtos (vernizes, ceras, gorduras, óleos, graxas), agente de limpeza a seco, anestésico, em extintores de incêndio, intermediário na fabricação de corantes e agrotóxicos, fumigante para grãos e na fabricação de hidroclorofluorcarbonos (HCFC) (CETESB, 2017).

Figura 4 – Estrutura química do clorofórmio



Fonte: CETESB (2017).

Atualmente seu uso como anestésico e em determinados medicamentos e cosméticos é proibido em alguns países (CETESB, 2017).

2.4.4 Óxido de Magnésio

O óxido de magnésio, de fórmula MgO é um pó fino branco, inodoro e de densidade relativa de 3,58g/mL. Esse composto é capaz de se ligar a moléculas formando complexos insolúveis, além da possibilidade de utilização como um material refratário. Em razão da estabilidade desse solvente quando submetido a altas temperaturas, ele ainda é largamente empregado na catálise de reações. A presença de sítios básicos em sua superfície, juntamente com áreas específicas elevadas, torna possível seu emprego como catalisador de muitos processos orgânicos formando sais insolúveis (ARAÚJO, 2011).

2.4.5 Hidróxido de sódio

O hidróxido de sódio, de fórmula NaOH e massa molar 40 g/mol, é um sólido inodoro branco apresentado como grânulos, flocos ou pastilhas. Este reagente apresenta pH 14, quando em solução aquosa. É altamente higroscópico e solúvel em água e etanol e insolúvel em solventes apolares. Quando em solução aquosa é considerado uma base forte e por essa característica é empregado em diversos processos industriais, como fabricação de papel, tecido, sabão e detergente. Ainda é utilizado na purificação da água e como reagente laboratorial (CETESB, 2020).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes metanol, clorofórmio, óxido de magnésio e hidróxido de sódio, além de água ultrapura, foram utilizados para a preparação das soluções extratoras utilizadas nos diferentes processos de extração.

3.2 Preparação das amostras

Para a realização do experimento, foi utilizado café da espécie *Coffea arábica* da variedade Catuaí, onde as amostras foram retiradas de plantas jovens, em vasos, com aproximadamente 15 cm de altura, foi preparada uma mistura das folhas, com exceção dos cotilédones. As amostras foram preparadas de duas diferentes formas: frescas (Figura 5) e secas em estufa (Figura 6).

Figura 5 – Folhas frescas de café



Fonte: Do autor (2021).

Figura 6 – Folhas secas de café



Fonte: Do autor (2021).

As folhas foram maceradas com o almofariz utilizando nitrogênio líquido até se transformarem em um pó fino, em seguida foram armazenadas a -80°C até o momento da extração.

3.3 Processo de extração

Para garantir confiabilidade ao resultado dos protocolos de extração, as análises foram feitas em triplicata para cada tipo de amostra, além disso os protocolos de extração foram adaptados aos equipamentos que o laboratório disponibilizava.

3.3.1 Extração com clorofórmio

Baseado no método de Fernandes (2007) foram pesadas 150 mg de amostra (Quadro 1) em que foram adicionados 1500 μL de clorofórmio, em seguida a mistura foi deixada sob agitação mecânica por 20 minutos a temperatura ambiente.

Após a agitação, os tubos contendo as amostras foram centrifugados por 5 minutos a 13000 g e temperatura ambiente, após o término, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro hidrofóbico de 0,22 μm . Em seguida o clorofórmio foi evaporado com a ajuda do concentrador e o resíduo foi ressuscitado em 1000 μL de água ultrapura e novamente foi filtrado utilizando filtro hidrofílico de 0,22 μm de diâmetro de poro.

Quadro 1 - Massa das amostras para extração com clorofórmio.

Amostra Fresca		Amostra Seca	
Replicata	Massa (mg)	Replicata	Massa (mg)
1	158,30	1	131,90
2	166,20	2	139,20
3	165,50	3	155,00

Fonte: Do autor (2021).

3.3.2 Extração com óxido de magnésio

Segundo a metodologia proposta por Madeira *et al.* (2017), foram pesados 150 mg de amostra (Quadro 2) e 600 mg de óxido de magnésio, em seguida 10 ml de água foram adicionados e a mistura foi deixada em banho-maria fervente por 20 minutos, e homogeneizando algumas vezes. Após este processo foi colhido o sobrenadante e filtrado com filtro hidrofílico 0,22 μm de diâmetro de poro.

Quadro 2 - Massa das amostras para extração com óxido de magnésio.

Amostra Fresca		Amostra Seca	
Replicata	Massa (mg)	Replicata	Massa (mg)
1	163,00	1	153,80
2	158,90	2	148,80
3	160,70	3	152,30

Fonte: Do autor (2021).

3.3.3 Extração com água

Baseado na metodologia tradicional utilizada no cotidiano, foram pesados 200 mg de amostra (Quadro 3) e adicionados 2 ml de água ultrapura, em seguida as amostras foram deixadas em banho ultrassônico por 30 minutos e logo após filtradas com filtro 0,22 μm de diâmetro de poro.

Quadro 3 - Massa das amostras para extração com água.

Amostra Fresca		Amostra Seca	
Replicata	Massa (mg)	Replicata	Massa (mg)
1	205,10	1	200,00
2	212,90	2	207,50
3	210,60	3	208,60

Fonte: Do autor (2021).

3.3.4 Extração com hidróxido de sódio

De acordo com a metodologia proposta por Bizzotto *et al* (2013) foram pesados 200 mg de amostra (Quadro 4) e adicionados 2 ml de NaOH (0,2 mol/L) e 4 mL de clorofórmio, a mistura foi deixada sob agitação mecânica por 7 minutos e em seguida a fase orgânica foi separada, e a fase aquosa foi lavada 3 vezes com 1 mL de clorofórmio.

Após este processo o clorofórmio foi evaporado com ajuda do concentrador e o resíduo foi ressuspensionado em 1 mL de água ultrapura e filtrado com filtro 0,22 μm de diâmetro de poro.

Quadro 4 - Massa das amostras para extração com clorofórmio.

Amostra Fresca		Amostra Seca	
Replicata	Massa (mg)	Replicata	Massa (mg)
1	208,40	1	203,40
2	217,80	2	206,90
3	203,50	3	217,10

Fonte: Do autor (2020).

3.3.5 Extração com metanol

Segundo a metodologia descrita por Zhao *et al* (2014) foram pesados 50 mg de amostra (Quadro 5) e adicionados 1250 μ L de metanol 80%, em seguida as amostras foram submetidas ao vórtex e deixadas no banho seco por 30 minutos a 900 rpm e 70°C. Ao término deste processo as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3500g e 4°C, em seguida o sobrenadante foi recolhido e filtrado com filtro 0,22 μ m de diâmetro de poro.

Quadro 5 - Massa das amostras para extração com clorofórmio

Amostra Fresca		Amostra Seca	
Replicata	Massa (mg)	Replicata	Massa (mg)
1	57,10	1	59,30
2	59,70	2	58,80
3	59,80	3	59,80

Fonte: Do autor (2020).

3.4 Curva analítica

Para a quantificação da cafeína presente nas amostras foi necessário a preparação de soluções padrão com as seguintes concentrações: 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm e 100 ppm. A partir disto foi obtida a seguinte curva analítica: $y = 15960,2 \cdot x + 15359,1$ com $r^2 = 0,9995$.

3.5 Processo de análise

Após os processos de extração as amostras foram submetidas a análise em um sistema HPLC Shimadzu, constituído por duas bombas LC-20AD, degaseificador DGU-20A³, sistema de controle CBM-20A, forno de coluna CTO-20A, detector SPD-M20A e amostrador automático SIL-20AHT. Os dados foram adquiridos e processados com uso

do software LC-Solution. Os resultados foram obtidos através do comprimento de onda de 274 nm e a corrida foi realizada utilizando Coluna Ascentis Express C₁₈, 15cm x 2,1mm, 2,7µm (Supelco) e Coluna de guarda Ascentis Express C₁₈, 5mm x 2,1mm, 2,7µm (Supelco), volume de injeção de 20 µL e temperatura do forno a 40°C. Além disso a corrida dura 7 minutos, com um fluxo de 2 mL/min de uma fase móvel composta de 83% água, 11% metanol e 6% acetonitrila.

4. RESULTADOS

Como resultado das análises foram encontradas as concentrações de cafeína em mg/L e sua porcentagem em relação a massa total de amostra, além disso, devido ao fato de as análises serem realizadas em triplicata, também foi possível obter a média e o desvio padrão para cada tipo de amostra e metodologia.

Através da injeção com padrão de cafeína, foi possível identificar o tempo de retenção da molécula como 3,2 minutos.

De acordo com Clarke & Macrae (2011) a espécie de café em questão possui aproximadamente 1% de cafeína, dessa forma, esse será o valor de referência utilizado para fins de comparação. Os resultados obtidos são apresentados abaixo:

4.1 Extração com clorofórmio

A utilização do clorofórmio se dá pelo fato da cafeína ser mais solúvel neste composto do que em água, dessa forma é esperado que ele extraia melhor a molécula em questão.

A extração com clorofórmio, tanto para amostras frescas quanto para secas, apesar de ter apresentado uma porcentagem baixa em relação ao esperado (Quadros 6 e 7), obteve-se um cromatograma (Figuras 7 e 8) com picos bem resolvidos e sem a presença de ruídos, além disso é possível perceber a presença de um pico bem resolvido referente a trigonelina em 1,7 minutos, que foi confirmado através da adição de padrão.

Quadro 6 - Quantificação de cafeína em folhas frescas e extração com clorofórmio.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de Cafeína
1	105,17	0,066
2	90,05	0,054
3	52,95	0,032

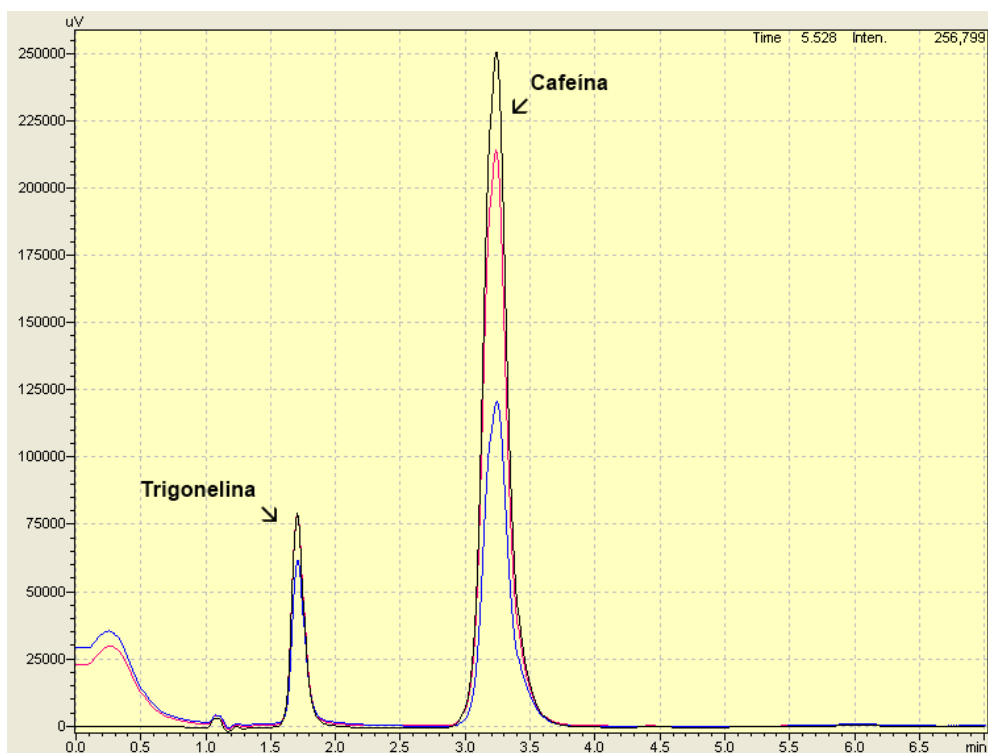
Fonte: Do autor (2021).

Quadro 7 - Quantificação de cafeína em folhas secas e extração com clorofórmio.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de Cafeína
1	35,24	0,027
2	85,55	0,061
3	60,42	0,039

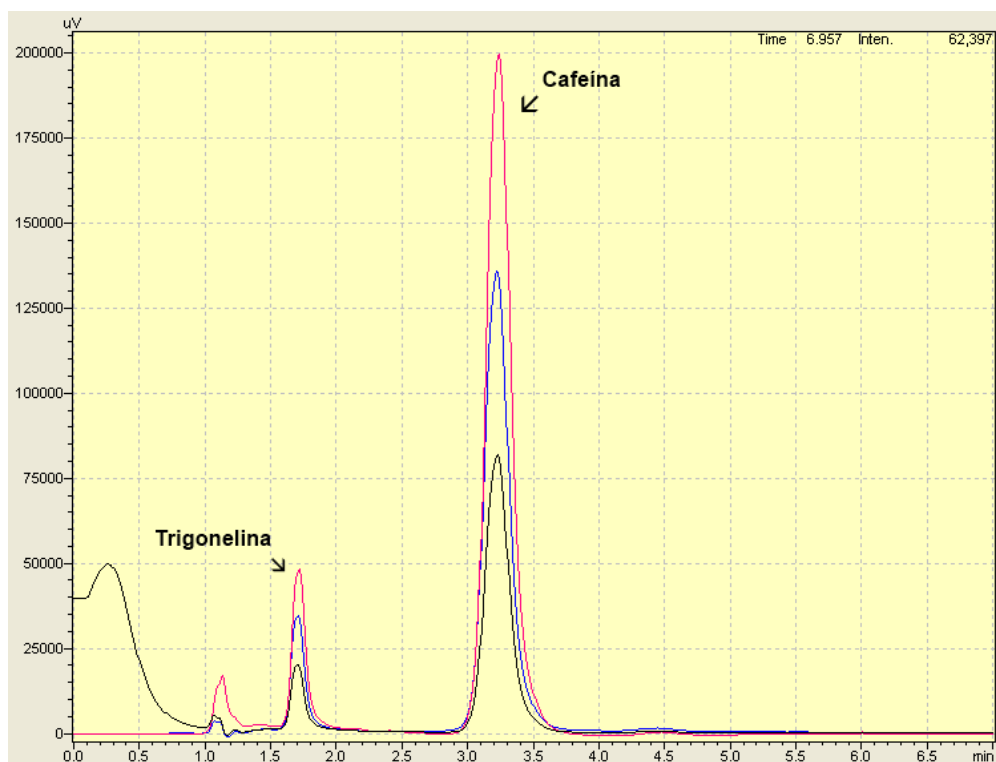
Fonte: Do autor (2021).

Figura 7 - Cromatograma referente a extração com clorofórmio em folhas frescas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

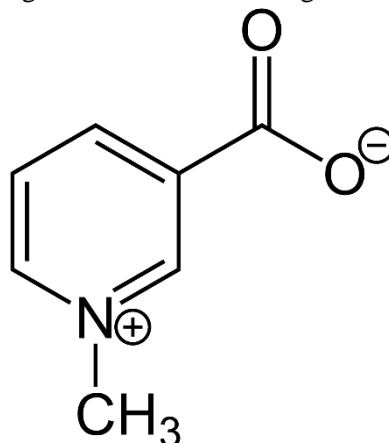
Figura 8 - Cromatograma referente a extração com clorofórmio em folhas secas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

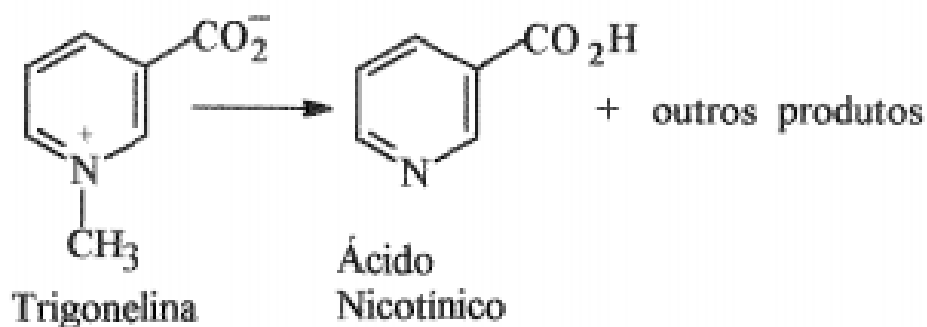
A trigonelina (Figura 9) é um alcalóide encontrado no café, que pode influenciar principalmente sua função nutricional, mas também no sabor. Em grãos de café, durante a torrefação, a trigonelina é degradada termicamente, se transformando em ácido nicotínico e outros produtos (figura 10) também conhecido como niacina, ou vitamina B3. Após a torrefação, a trigonelina restante influencia no amargor encontrado no café. (SALDAÑA, 1997)

Figura 9 – Estrutura da trigonelina.



Fonte: Silva et al. (2013).

Figura 10 – Degradação da trigonelina

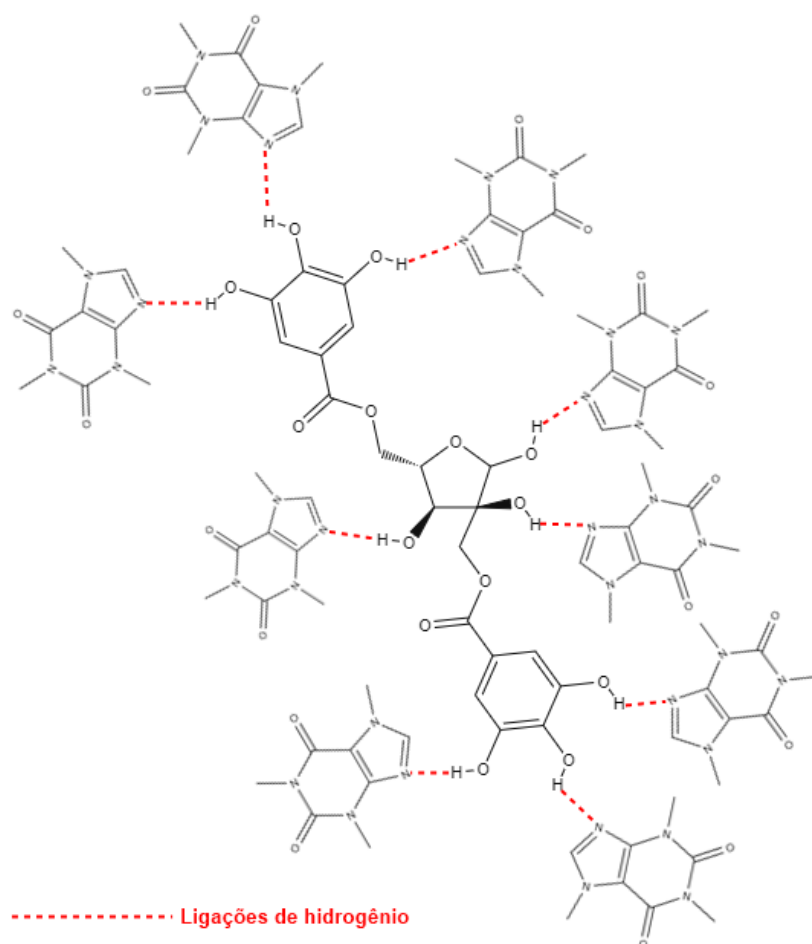


Fonte: Saldaña (1997).

4.2 Extração com óxido de magnésio

A presença de taninos em extratos vegetais podem ser uma complicação para a extração da cafeína, uma vez que associam através de ligações de hidrogênio do átomo de nitrogênio não metilado da cafeína e o grupo hidroxila dos taninos (Figura 11) (RIBEIRO *et al*, 2012).

Figura 11 - Complexo formado entre um tanino e moléculas de cafeína.



Fonte: Do autor (2021).

Dessa forma, a utilização do óxido de magnésio visa a formação de sais insolúveis com os taninos, que se precipitam em água e deixam a cafeína livre para ser extraída. (BRENELLI, 2003)

Ao observar a quantificação da cafeína (Quadros 8 e 9), é também possível constatar que os resultados obtidos estão abaixo do valor de referência. Em relação ao cromatograma (Figuras 12 e 13), também é possível perceber a presença de ruídos e picos indesejáveis.

Estes picos podem ser referentes ao óxido de magnésio utilizado a extração, porém ao comparar os resultados com a extração utilizando clorofórmio, é possível notar um aumento da % de cafeína, por se tratarem de amostras inicialmente iguais, podemos atribuir este aumento a utilização do óxido de magnésio, que cumpre sua função de deixar a cafeína livre dos taninos.

Quadro 8 - Quantificação de cafeína em folhas frescas e extração com óxido de magnésio.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de Cafeína
1	14,10	0,087
2	12,45	0,078
3	13,00	0,081

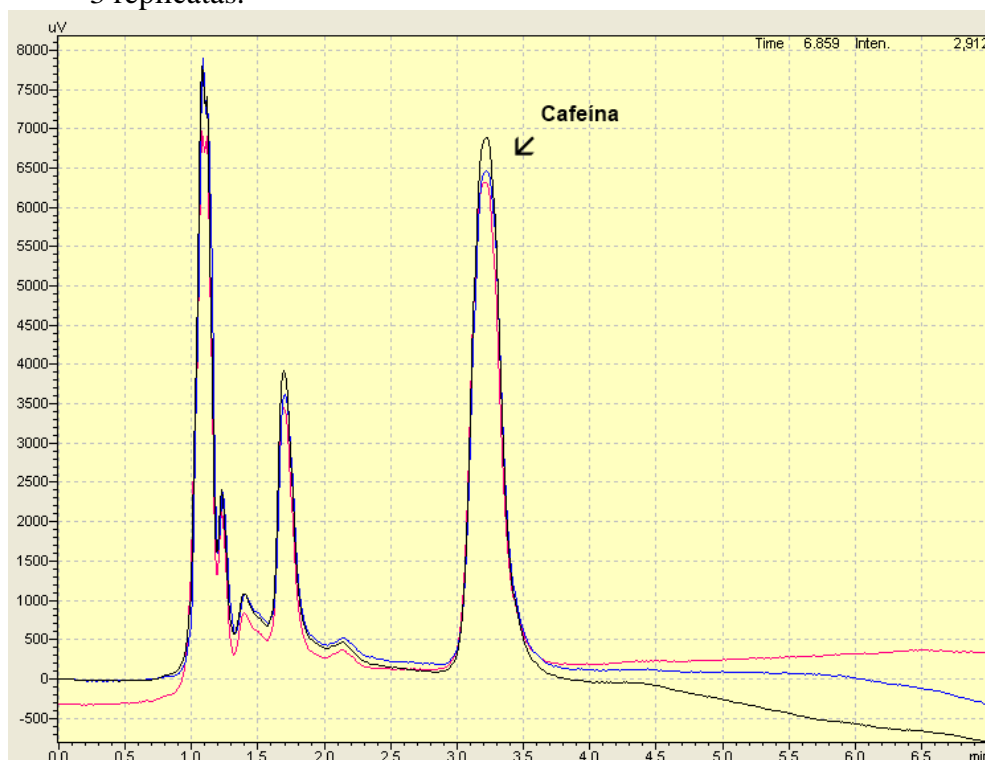
Fonte: Do autor (2021).

Quadro 9 - Quantificação de cafeína em folhas secas e extração com óxido de magnésio.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de Cafeína
1	55,40	0,360
2	49,80	0,335
3	56,40	0,370

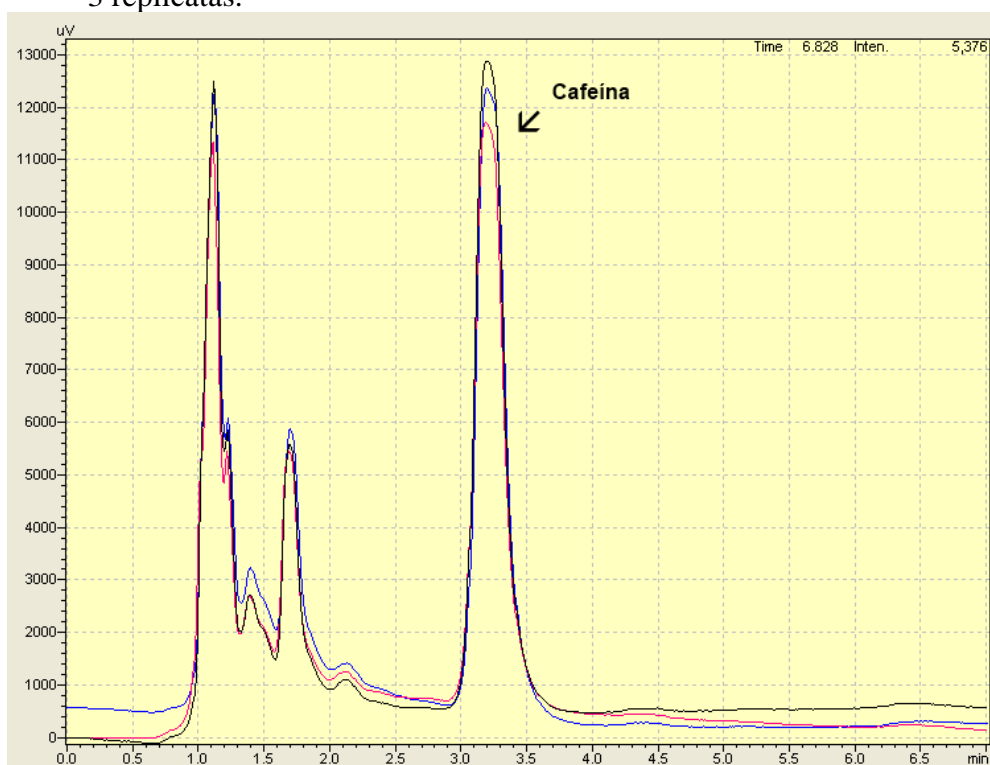
Fonte: Do autor (2021).

Figura 12 – Cromatograma referente a extração com óxido de magnésio em folhas frescas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

Figura 13 – Cromatograma referente a extração com óxido de magnésio em folhas secas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

4.3 Extração com água

A extração com água segue o mesmo princípio que usamos ao fazer café coado em casa: a infusão. Apesar da cafeína não ser muito solúvel em água a temperatura ambiente, à medida que a temperatura aumenta, as interações intermoleculares aumentam e a solubilidade da cafeína também aumenta. Por este motivo optamos por utilizar o banho ultrassônico, aumentando as interações e solubilizando a cafeína na água para, em seguida, ser quantificada.

Este processo de extração resultou em um padrão cromatográfico (Figuras 14 e 15) bem parecido com o da extração com óxido de magnésio, e da mesma forma, não possui um pico simétrico e bem resolvido, já que apresenta um ombro em seu cume. Em relação à quantificação (Quadros 10 e 11), os resultados também ficaram abaixo do valor de referência.

Quadro 10 - Quantificação de cafeína em folhas frescas e extração com água.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de Cafeína
1	83,30	0,081
2	70,10	0,066
3	72,80	0,069

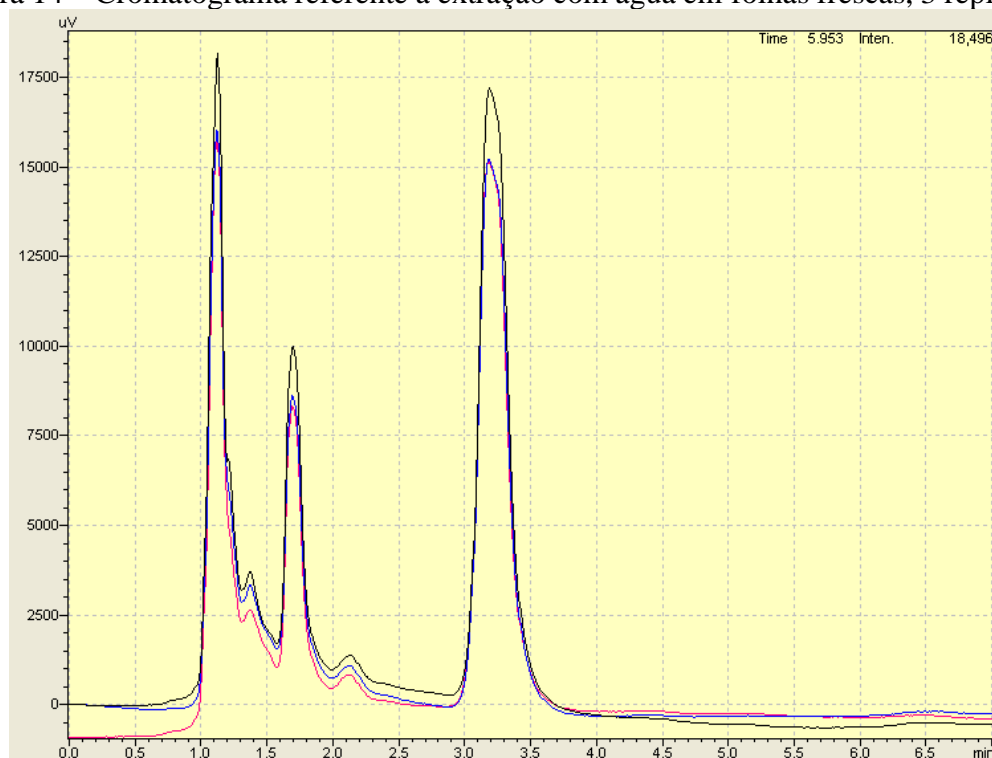
Fonte: Do autor (2021).

Quadro 11: Quantificação de cafeína em folhas secas e extração com água.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de Cafeína
1	242,40	0,242
2	124,80	0,120
3	157,80	0,151

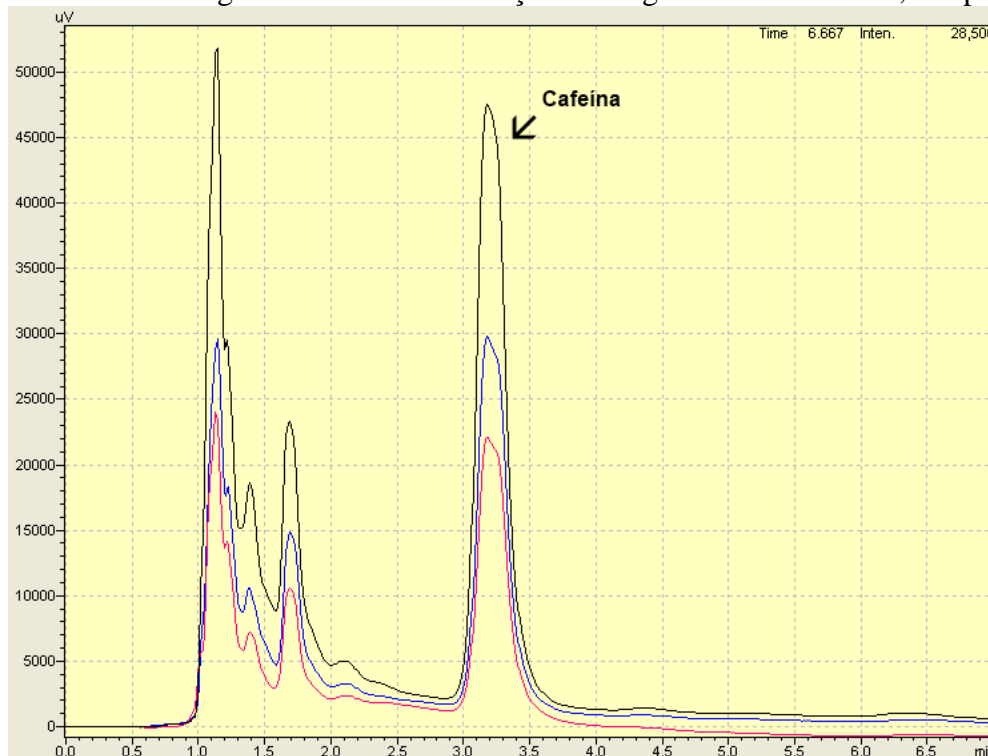
Fonte: Do autor (2021).

Figura 14 – Cromatograma referente a extração com água em folhas frescas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

Figura 15 – Cromatograma referente a extração com água em folhas secas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

4.4 Extração com hidróxido de sódio

Para este processo de extração, a solução de hidróxido de sódio foi utilizado para extrair a cafeína da amostra, e em seguida o clorofórmio foi utilizado na intenção de ‘retirar’ a cafeína da fase alcalina, visto que ela é extremamente solúvel na fase orgânica.

A quantificação apresentou valores bem baixos (Quadros 12 e 13) e ao observar o cromatograma das amostras frescas (Figura 16) podemos perceber que a linha de base possui bastante ruído, além de apresentar um ombro no cume do pico.

Entretanto, o cromatograma das amostras secas (Figura 17) apresentou uma linha de base bem limpa, com um pico bem resolvido, porém, apresentou um ombro em seu cume.

Além disso, foi possível constatar um erro no processo de extração, uma vez que duas das três amostras frescas não apresentaram sequer o pico referente a cafeína.

Quadro 12 - Quantificação de cafeína em folhas frescas e extração com hidróxido de sódio.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de Cafeína
1	0,43	0,000
2	0,00	0,000
3	16,36	0,008

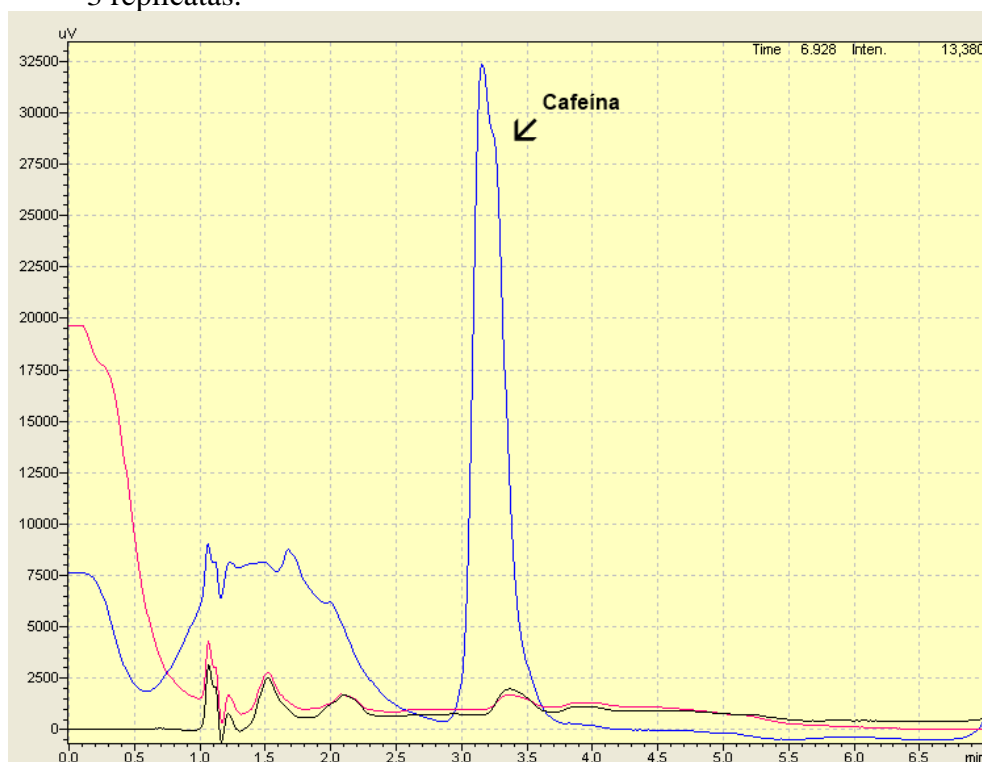
Fonte: Do autor (2021).

Quadro 13 - Quantificação de cafeína em folhas secas e extração com hidróxido de sódio.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de Cafeína
1	437,23	0,215
2	582,62	0,282
3	514,17	0,237

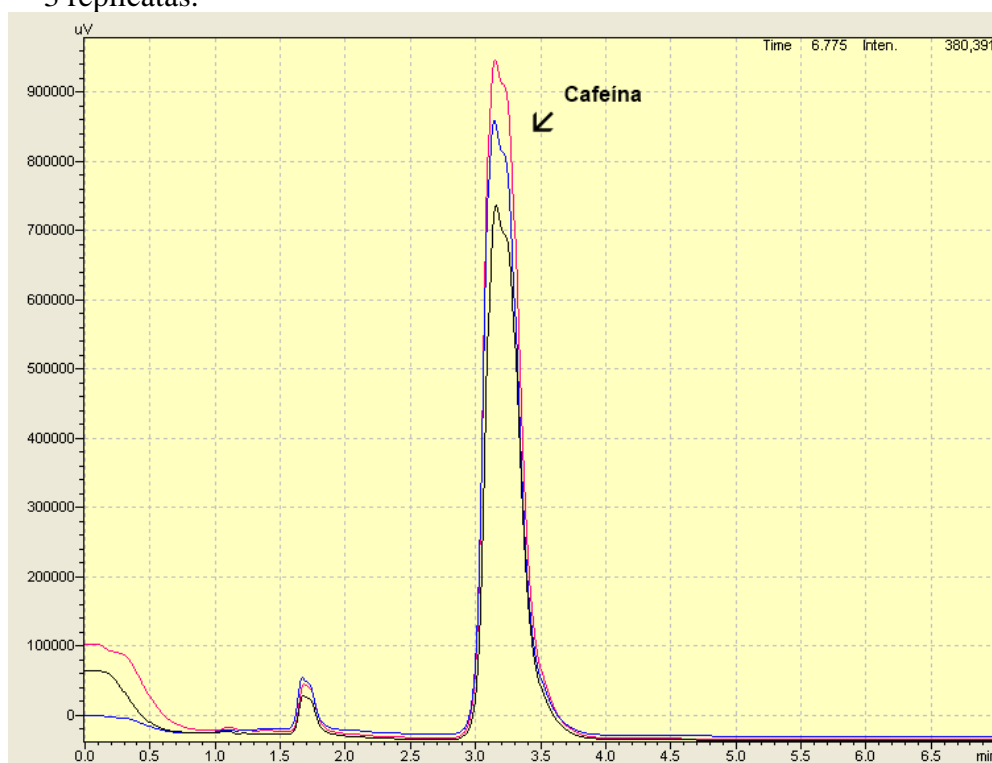
Fonte: Do autor (2021).

Figura 16 – Cromatograma referente a extração com hidróxido de sódio em folhas frescas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

Figura 17 – Cromatograma referente a extração com hidróxido de sódio em folhas secas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

4.5 Extração com metanol

Ao observar a quantificação (Quadros 14 e 15) referente a extração com metanol podemos observar que, novamente, os valores ficaram abaixo dos valores de referência. E observando os cromatogramas (Figuras 18 e 19) podemos perceber uma linha de base com muito ruído, além do ombro presente na extremidade do pico.

Quadro 14 - Quantificação de cafeína em folhas frescas e extração com metanol.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de Cafeína
1	29,50	0,065
2	55,20	0,116
3	26,90	0,056

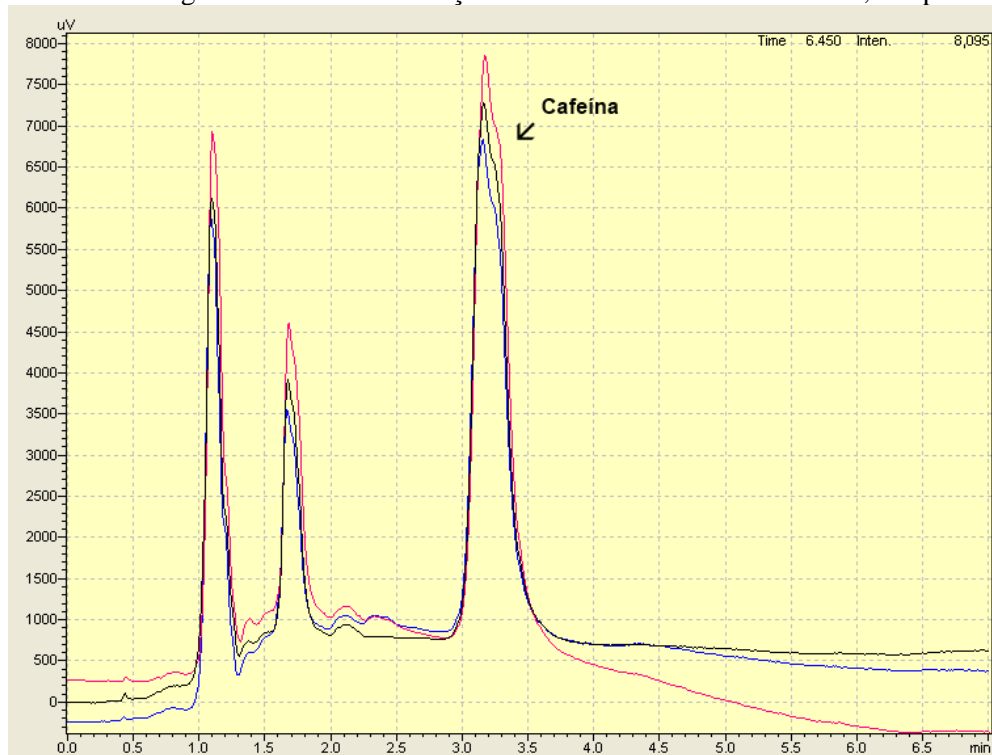
Fonte: Do autor (2021).

Quadro 15 - Quantificação de cafeína em folhas secas e extração com metanol.

Replicata	Concentração Cafeína (ppm)	% de cafeína
1	242,90	0,512
2	252,70	0,537
3	255,10	0,533

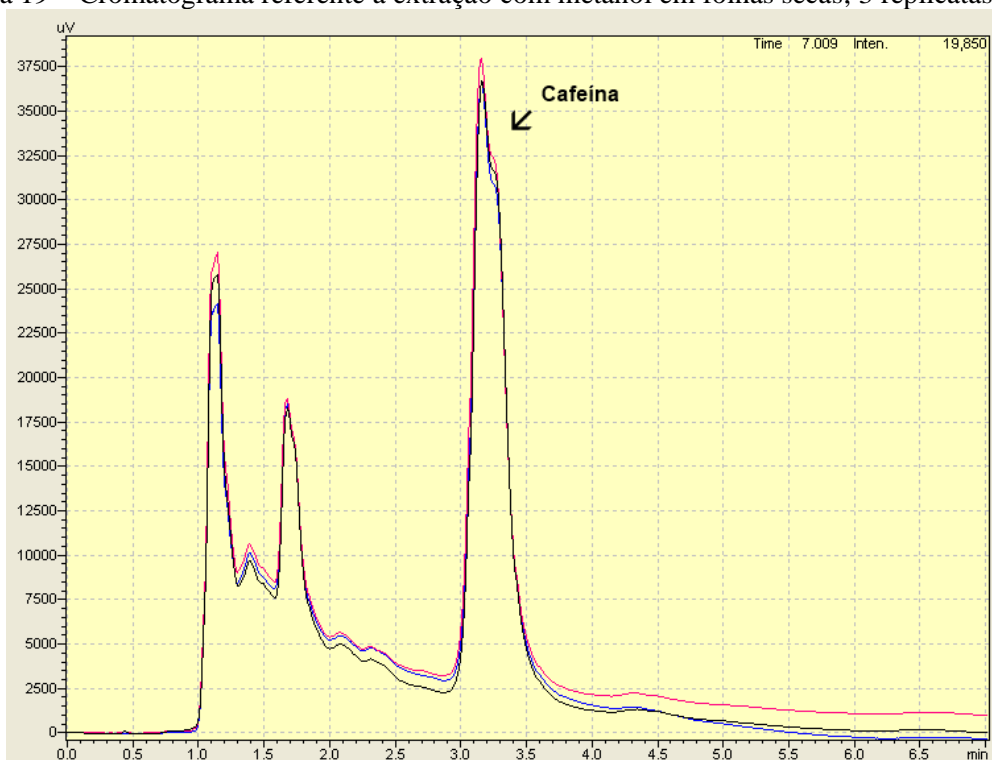
Fonte: Do autor (2021).

Figura 18 – Cromatograma referente a extração com metanol em folhas frescas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

Figura 19 – Cromatograma referente a extração com metanol em folhas secas, 3 replicatas.



Fonte: Do autor (2021).

4.6 Comparação entre os métodos

Inicialmente na comparação dos métodos é observada a média da porcentagem de cafeína das amostras em cada extração (Quadro 16).

Quadro 16 - Dados estatísticos das extrações.

	Tipo de amostra	MÉDIA	DESVIO PADRAO
Clorofórmio	Fresca	0,05	0,017
	Seca	0,04	0,018
Óxido de Magnésio	Fresca	0,08	0,004
	Seca	0,36	0,018
Água	Fresca	0,07	0,008
	Seca	0,17	0,063
Hidróxido de Sódio	Fresca	0,01	0,000
	Seca	0,24	0,034
Metanol	Fresca	0,08	0,032
	Seca	0,53	0,014

Fonte: Do autor (2021).

Ao observar as médias, todas ficaram abaixo do valor de referência, porém é importante lembrar que este valor de referência é variável, pois até o horário do dia em que a folha é colhida influencia na quantidade de cafeína presente na mesma, mas o processo que mais se aproximou foi a extração utilizando metanol em amostras secas.

Além disso, dentre todos os métodos este é o que utiliza a menor quantidade de matéria na hora da extração: 50 mg. Entretanto seu cromatograma não ficou tão limpo quanto o esperado, ou com um pico bem resolvido.

O cromatograma mais próximo do esperado seria os apresentados na extração com clorofórmio, que apresentou o pico bem limpo e além disso, também foi capaz de detectar a trigonelina, que também é muito estudada por pesquisadores da área cafeeira.

Entre todos os métodos, os melhores foram: com clorofórmio devido ao cromatograma, e com metanol, devido à baixa quantidade de amostra necessária, quantificação e melhor eficiência da extração.

Outro fator muito importante na hora de escolher o melhor método de extração é pensar na toxicidade do solvente utilizado. Segundo as fichas técnicas do clorofórmio e do metanol, apresentadas pelas empresas CHEMCO e SOUTHERN, respectivamente, o clorofórmio apresenta toxicidade aguda oral DL 50 de 2000 mg/kg, enquanto o metanol apresenta 7300 mg/L, ambas testadas em ratos. Dessa forma, podemos concluir que o clorofórmio é mais prejudicial à saúde, pois necessita de uma menor quantidade de produto para se tornar tóxico.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi notável que a utilização de amostras secas favoreceu o processo de extração, também foi possível definir os dois melhores métodos, porém entre eles, observando a quantificação, quantidade de amostra necessária, cromatogramas e toxicidade, foi possível concluir que o melhor método é o processo de extração com metanol. Além disso, é importante ressaltar que a extração com clorofórmio também obteve a identificação da trigonelina. Em relação ao metanol, apesar de ser necessário um novo estudo para melhoria do método analítico em relação aos cromatogramas, ele se mostrou muito eficiente no objetivo proposto.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Consulta Pública nº 312, de 20 de fevereiro de 2017**. [S. l.], 2017. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2949405/CONSULTA+PUBLICA+N+312+COFAR.pdf/31ad3eb8-888c-434e-b7e6-119191479504>. Acesso em: 7 abr. 2020.

ARAÚJO, D. R. **Síntese e caracterização de óxido de magnésio obtido por diferentes técnicas e sua aplicação na produção de Biodiesel**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/8898>. Acesso em: 3 fev. 2021.

ARAÚJO, M. N. **Extração de óleo de borra de café usando dióxido de carbono supercrítico e etanol (scCO₂+EtOH)**. 2019. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Pós-Graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2019. Disponível em: <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/trabalhoConclusaoWS?idpessoal=58977&idprograma=40001016056P9&anobase=2019&idtc=6>. Acesso em: 1 abr. 2020.

BIZZOTTO, C. S. **Multivariate optimization of residual caffeine extraction from decaffeinated coffee**. *Eclética Química*, Campinas, v. 38, p. 45-53, jan. 2013. Disponível em: <https://revista.iq.unesp.br/ojs/index.php/eletica/article/view/98/67>. Acesso em: 11 jan. 2021.

BORRELL, B. **Plant biotechnology: Make it a decaf**. *Nature News*, v. 483, p. 264-266, 15 mar. 2012. Disponível em: https://www.nature.com/news/polopoly_fs/1.102121!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/483264a.pdf. Acesso em: 17 abr. 2021.

BRAGA, S. L. **Guia para desenvolvimento e otimização de métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação de fármacos**. 2018. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2018. Disponível em: https://www.monografias.ufop.br/bitstream/35400000/1070/1/MONOGRAFIA_GuiaDesenvolvimentoOtimiza%C3%A7%C3%A3o.pdf. Acesso em: 20 nov. 2020.

BRENELLI, E. C. S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. *Química Nova* [online], v.26, n.1, p.136-138, 2003. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422003000100023&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 21 jan. 2021

CAZARIM, M. S.; UETA, J. **Café: uma bebida rica em substâncias com efeitos clínicos importantes, em especial a cafeína.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 35, ed. 3, p. 363-370, 2014.

CETESB. **Clorofórmio.** São Paulo, SP, mar 2017. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/Cloroformio.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2021.

CETESB. **Hidróxido de sódio.** São Paulo, SP, jul 2020. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/Cloroformio.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2021.

CHEMCO INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA (CHEMCO). **Ficha de informações de segurança de produto químico.** Disponível em: <http://www.dbi.ufla.br/biologiacelular/wp-content/uploads/Clorof%C3%B3rmio.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2021.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee: Volume 2: technology.** Nova York: Elsevier Science Publishers, 2011. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=NlcGCAAAQBAJ&printsec=copyright&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false . Acesso em: 02 fev. 2021

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café,** v. 6– Safra 2020, n. 3 - Terceiro levantamento, Brasília, p. 1-54, setembro 2020. ISSN 2318-7913.

COSTA, J. O. **Padrões de resposta termal ao déficit hídrico na cultura do café irrigado por gotejamento.** 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2016. Disponível em: http://200.235.128.121/bitstream/handle/123456789/11998/Dissertacao_Jefferson%20de%20Oliveira%20Costa.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 11 nov. 2020.

DURÁN, C. A. A. *et al.* **Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida.** **Revista Virtual de Química,** v. 9, ed. 1, p. 107-134, 2017. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v9n1a10.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2021.

FASSIO, L. H.; SILVA, A. E. S. Importância Econômica e Social do Café Conilon. In: FERRÃO, R. G. *et al.* (ed.). **Café Conilon**. 1. ed. Vitória, ES: Embrapa, 2007. p. 34-49. ISBN 978-85-89274-12-8.

FERNANDES, G. *et al.* **Extração e purificação de cafeína da casca de café**. 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15255/1/GFernandesDISSPRT.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2021

GUERRA, R. O. *et al.* **Cafeína e esporte**. Revista Brasileira de Medicina e Esporte, Niterói, v. 6, n. 2, p. 60-62, abr 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922000000200006&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 7 jan 2021. (MATA et al., 2020). Grand View Research (GVR). **Decaffeinated Coffee Market Size, Industry Report, 2020-2027**. Market Analysis Report, 2020. 80 p. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/decaf-coffee-market>. Acesso em: 17 abr. 2021.

LANÇAS, F. M. A **Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis?”** Scientia Chromatographica, São Paulo, SP, v. 1, ed. 2, p. 35-61, 2009. Disponível em: <http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n2a4.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2020.

LIMA NETO, E. P. **Perspectivas da reestruturação das indústrias da química e da energia: a via metanol**. 2009. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos (TPQB) da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2009. Disponível em: <http://epqb.eq.ufrj.br/download/industrias-da-quimica-e-da-energia-a-via-metanol.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2020.

MADEIRA, T. B. *et al.* Desenvolvimento, validação e aplicação de um método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína por UHPLC-DAD em café torrado e moído. **Scientia Chromatographica**, Londrina, v. 9, n. 3, p. 160-170, nov. 2017. GN1 Genesis Network.

MATA, V. *et al.* **Suplementação de cafeína em exercícios anaeróbios**. Advances in Nutritional Sciences, v. 1, ed. 1, p. 73-79, set 2020. Disponível em: <https://journal.healthsciences.com.br/index.php/ans/article/view/13/9>. Acesso em: 7 jan. 2021.

MELO, J. R. *et al.* Café: origem e contribuição para a economia do Brasil. **Revista Científica Interdisciplinar.**, v. 1, ed. 3, p. 15-25, jan/jun 2018. DOI <http://dx.doi.org/xx.xxxxx/xxxx-xxxx/v1n1a1>. Disponível em: <http://multiplosacessos.com/multaccess/index.php/multaccess/article/view/60/45>. Acesso em: 5 jan. 2021.

PASA, C.; PASA, P. **Ergogênico cafeína e atividade física na saúde.** Múltiplos Olhares sobre a Biodiversidade, v. 5. 1ed.: Editora TantaTinta, 2017, p. 452-458.

PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos.** 2014. 118 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2014. Disponível em: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/28121/1/TeseMestrado_HelenaPorto.pdf. Acesso em: 25 mar. 2020.

RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z.; BARRETO, D. W. Obtenção de extratos de guaraná ricos em cafeína por processo enzimático e adsorção de taninos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 261-270, set. 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232012000300010&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 08 fev. 2021

ROCHA, T. A. M.C. **Desenvolvimento e validação de um método de HPLC-DAD-FLD para a determinação de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) em suplementos alimentares à base de plantas.** 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) - Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2015.

SALDAÑA, M. D. A. **Extração de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico dos grãos de café com CO₂ supercrítico.** 1997. 209 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/267507/1/ArandaSaldana_MarlenyDoris_M.pdf. Acesso em: 04 fev. 2021.

SANTOS, R. S. **A percepção sobre a regularização e aspectos ambientais na atividade cafeeira no município de Capelinha-MG.** 2016. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) - Instituto Federal de Minas Gerais, São João Evangelista, MG, 2016. Disponível em: https://www.sje.ifmg.edu.br/portal/images/artigos/biblioteca/TCCs/Agronomia/2016/R ENATA_DA_SILVA_SANTOS.pdf. Acesso em: 5 jan. 2021.

SILVA, C. F. *et al.* **Conduta clínica frente ao delirium: uma emergência de difícil diagnóstico.** *Revista Uningá*, v.1, n.101, 2013.

SILVA, C. J. R. S. *et al.* Determinação do teor de cafeína em diferentes tipos de cafés. **DEMETRA: Alimentação, nutrição & saúde**, v. 13, ed. 2, p. 477-484, 2018. Disponível em: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/demetra/article/view/30653/25616>. Acesso em: 7 jan. 2021.

SILVA, T. M. L. **Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para pesquisa de enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras.** 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/31554/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Tha%20ADs%20Michelle%20Liziere%20da%20Silva.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2020.

SILVA, W. P. **Determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.** 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2017. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/18156/1/DeterminacaoSimultaneaPropifenazona.pdf>. Acesso em: 7 jan. 2021.

SIMÕES, J.C. **Diagnóstico da cafeicultura mineira – 1: regiões tradicionais – Sul/Sudoeste de Minas, Zona da Mata, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba/** Org.: Juliana Carvalho Simões, Djalma Ferreira Pelegrini. – Belo Horizonte: EPAMIG, 2010. 56p. – (EPAMIG. Série Documentos, 46). ISSN 0102-2164

SOUTHERN CHEMICAL CORPORATION (SCC). **Ficha de dados de segurança do metanol.** Disponível em: <https://southernchemical.com/wp-content/uploads/SCC-SDS-Portugese.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2021

ZHAO, F. *et al.* Simultaneous Determination of Caffeine and Some Selected Polyphenols in Wuyi Rock Tea by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 13, p. 2772-2781, mar. 2014. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf4056314>. Acesso em: 7 jan. 2021.