

Desenvolvimento, validação e aplicação de um método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína por UHPLC-DAD em café torrado e moído

Development, validation and application of a rapid and sensitive method for determining trigonelline and caffeine by UHPLC-DAD present in roasted and ground coffee

Tiago Bervelieri Madeira, Giselle Lopes Silva, Lycio Shinji Watanabe, Caroline Teixeira Lopes, Alexandre Vinicius Guedes Mazalli, Mariana Bortholazzi Almeida, Suzana Lucy Nixdorf*

Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica (DIA), Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia CID, Pr 445, Km 380 CEP 86.057-970-Londrina, PR, Brasil

*snixdorf@uel.br

Recebido: 04/09/2017

Aceito: 01/11/2017

Resumo

A trigonelina e a cafeína são alcaloides do grupo das xantinas de grande importância biológica. Estão presentes em inúmeros alimentos e fármacos, atuando de diferentes maneiras, com ação estimulante, sendo precursores de compostos bioativos e, como pró-fármacos. Despertam crescente interesse na determinação de seus teores pela diversidade de aplicações, sendo utilizados, por exemplo, como marcadores na diferenciação entre café arábica (*Coffea arabica*) e robusta (*Coffea canephora*). Por este motivo, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método cromatográfico sensível para determinação rápida de trigonelina e cafeína em café por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (UHPLC-DAD). O método desenvolvido foi validado segundo a RE 899/2003 da ANVISA e, aplicado na análise de cafés do tipo torrado e moído comerciais. O método mostrou-se adequado para todas as figuras de mérito, com faixa linear de trabalho de 0,20 a 2,00 %(m/m) para a trigonelina e de 0,60 a 6,00 %(m/m) para a cafeína, com limites de quantificação de 0,03 e 0,06 %(m/m) e de detecção de 0,01 e 0,02 %(m/m), respectivamente. Quanto a precisão apresentou repetitividade com desvio padrão relativo (DPR) de 0,12% para a trigonelina e 0,55% para a cafeína, e DPR para a precisão intermediária respectivamente de 0,52 e 1,14%(m/m), apresentando exatidão média de 99,80% em 3 níveis de concentração baixa, média e alta, para ambos os compostos. O método destina-se a auxiliar no controle de qualidade de cafés torrado e moído comerciais.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, blends de café, desenvolvimento de métodos, validação.

Abstract

Trigonelline and caffeine are alkaloids from the group of xanthines of great biological importance. They are found in numerous foods and drugs, acting in different ways, with stimulating action, being precursors of bioactive compounds and, as prodrugs. They arouse growing interest in their contents determination by the diversity of applications, being used, for example, as markers in the differentiation between arabica coffee (*Coffea arabica*) and robusta (*Coffea canephora*). For this reason, this study proposed the development of a sensitive chromatographic method for the rapid determination of trigonelline and caffeine in coffee by ultra high-performance liquid chromatography with diode array detection (UHPLC-DAD). The developed

method was validated according to ANVISA RE 899/2003 and applied in the analysis of commercial roasted and ground coffee. The method was suitable for all merit figures, with a linear working range of 0.20 to 2.00 % (w/w) for trigonelline and from 0.60 to 6.00 % (w/w) for caffeine, with limits of quantification of 0.03 and 0.06 % (w/w) and detection of 0.01 and 0.02% (w/w), respectively. It presented precision as repeatability with relative standard deviation (RSD) of 0.12% for trigonelline and 0.55% for caffeine, with RSD for the intermediate precision of 0.52 and 1.14%, respectively, with average accuracy of 99.80% in 3 levels of low, medium and high concentration, for both compounds. The method intends to assist in the quality control of commercial roasted and ground coffee.

Keywords: *Coffea arabica*, coffee blends, method development, validation.

1. Introdução

A trigonelina e a cafeína são alcaloides do grupo das xantinas e apresentam grande importância biológica, principalmente considerando ser a trigonelina precursora de compostos bioativos e a cafeína um estimulante (1). Pelo fato destes compostos serem considerados pró-fármacos, atuam na latência e formas avançadas de transporte de princípios ativos dos fármacos, como em antirretrovirais (2), ou intensificam a ação de alguns medicamentos para o tratamento do câncer. Por isso, são muito utilizados em associações farmacêuticas.

A trigonelina está presente em diversos alimentos amplamente consumidos pela população mundial como cevada, melão, milho, cebola, ervilha, soja, tomate, crustáceos, peixes, mexilhões e em maior concentração no café (3). Nesta planta, a importância biológica da trigonelina se deve, principalmente, ao fato de a mesma ser precursora da niacina no processo de torrefação do café, e precursora do ácido nicotínico durante o processo de desmetilação, ambos correspondentes à vitamina B3, aumentando o valor nutricional da bebida (1).

A cafeína por sua vez, é considerada uma droga estimulante, utilizada em fármacos e bebidas energéticas. Os efeitos comportamentais mais notáveis ocorrem após a ingestão de doses baixas a moderadas deste composto, verificando-se uma melhoria no desempenho cognitivo e psicomotor do consumidor. Essa melhora seu estado de alerta, energia, capacidade de concentração e do

desempenho em tarefas simples, diminuindo a sonolência e o cansaço, isto é, atuando na estimulação do sistema nervoso central de maneira geral. Porém, a cafeína ingerida em excesso pode ser prejudicial à saúde (4, 5). Portanto, efetuar sua quantificação é primordial.

O café destaca-se por ser uma das bebidas mais consumidas no mundo, um produto básico valioso, sendo a 2ª commodity básica de maior valor econômico, permanecendo somente atrás do petróleo (6). Entre os seus constituintes destacam-se os carboidratos, a cafeína e a trigonelina, que podem ser considerados como potenciais marcadores de qualidade (4, 5). Marcucci et al. (2013) (7) observaram que a espécie de café arábica apresenta, relativamente, menor concentração de cafeína e maior concentração de trigonelina quando comparada ao café robusta (conilon), ressaltando o potencial destes compostos em fornecer informações a cerca da qualidade e, da possível composição de bebidas provenientes de blends de café arábica e conilon (8, 9, 10).

Inúmeros métodos têm sido descritos para análise simultânea destas xantinas na literatura (5, 11, 12, 13), predominando o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa. Porém, ainda se tem explorado pouco os benefícios da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) que utiliza colunas cromatográficas com partículas de tamanho menor do que 2,0 µm, em geral de 1,7 µm. Esta técnica possibilita a injeção de volumes menores de amostra, com análises mais rápidas (inferiores a 3 min) com maior sensibilidade e resolução, ocasionando maior demanda para o

desenvolvimento de métodos analíticos que utilizem esta nova tecnologia.

Neste panorama, este trabalho visou desenvolver um método cromatográfico rápido e eficiente para determinação de trigonelina e cafeína empregando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos. O método foi validado segundo a normativa da ANVISA RE n° 899/2003 e utilizado para analisar amostras de cafés torrado e moído comerciais.

2. Experimental

2.1. Reagentes e padrões analíticos

As etapas de extração e preparo dos padrões analíticos foram realizadas com água ultrapura Milli-Q® (18,2 MΩ cm⁻¹ a 25 °C, Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA, EUA). As fases móveis utilizadas durante o processo de separação foram água ultrapura e acetonitrila (ACN) grau HPLC (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA). Foram utilizados padrões de trigonelina e cafeína com 99,99% de pureza, obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

2.2. Preparo das soluções padrão de trigonelina e cafeína

Para trigonelina preparou-se uma solução estoque de concentração 100,0 mg L⁻¹, pesando-se 0,01000 g de trigonelina anidra em balança analítica de 5 casas (XS205, Mettler-Toledo Columbus, OH, EUA). Uma solução estoque de cafeína na concentração de 300 mg L⁻¹ foi preparada, pesando-se 0,0300 g de cafeína anidra. Os padrões foram dissolvidos em água ultrapura Milli-Q®.

2.3. Sistema cromatográfico

Utilizou-se um sistema cromatográfico de ultra-alta performance (UPLC, Acquity Ultra Performance LC, Waters, Milford, EUA) composto por: bomba binária, sistema de gerenciamento de solventes e desgaseificador, injetor automático e detector de arranjo de diodo. Para injeção da amostra otimizou-se o volume de 1,0 µL no

modo *Partial Loop With Needle Overfill*, com solventes de lavagem fraca (H₂O) e forte (ACN), tendo as amostras sido mantidas a 10 °C. A coluna utilizada foi uma Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm; Waters) mantida a 40 °C durante toda análise. Para detecção dos analitos empregou-se um detector do tipo Acquity® Ultra Performance LC (Waters) e λ DAD no modo 3D, com varredura espectral de 190 a 400 nm, com comprimento de onda fixo em 272 nm.

2.4. Método cromatográfico

O método cromatográfico desenvolvido utilizou como fase móvel água (A) e acetonitrila (B) e eluição por gradiente, conforme as proporções descritas na Tabela 1.

2.5. Validação do método cromatográfico

O método cromatográfico foi validado segundo a normativa da ANVISA (RE n° 899/2003) sendo avaliados os parâmetros de especificidade, seletividade, precisão (repetitividade intra-dia), precisão intermediária (reprodutibilidade inter-dias), faixa dinâmica de trabalho e linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão (adição e recuperação) e robustez.

A especificidade e a seletividade do método proposto foram avaliadas considerando-se a ausência de sinais analíticos nos tempos de retenção dos padrões de trigonelina e cafeína no solvente extrator e na amostra de café. Esses parâmetros foram ainda confirmados pela porcentagem de recuperação, considerando-se a amostra de café sem adição de padrão e, a amostra de café adicionada de padrão. Como último recurso, utilizou-se a pureza espectral característica ao longo dos picos dos analitos, nos seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção.

A precisão foi avaliada para as concentrações de 0,8 % (m/m) para trigonelina e de 2,5 % (m/m) para cafeína pela repetitividade de 10 análises consecutivas da amostra e, a precisão intermediária de 2 análises consecutivas da amostra em 3 dias distintos (n=6) (Tab. 2).

Tabela 1. Proporções de água (A) e acetonitrila (B) utilizadas no método cromatográfico proposto

	Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	% A	% B	Curva
1	Inicial	0,4	99,0	1,0	6 - linear
2	1,00	0,4	50,0	50,0	6 - linear
3	1,01	0,4	5,0	95,0	6 - linear
4	1,10	0,4	5,0	95,0	6 - linear
5	1,11	0,4	99,0	1,0	6 - linear
6	3,00	0,4	99,0	1,0	6 - linear

A: Água ultrapura Milli-Q®; B: Acetonitrila.

A linearidade foi avaliada para a faixa de trabalho de 0,2 a 2,0 %(m/m) para a trigonelina e de 0,6 a 6,0 %(m/m) para a cafeína, utilizando o detector DAD(Acquity Ultra Performance LC, Waters, Milford, EUA).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir das equações das retas dos 2 compostos para o detector DAD.

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação para as concentrações de 0,2; 1,2 e 2,0 %(m/m) para a trigonelina e de 0,6; 3,0 e 6,0 %(m/m) para a cafeína utilizando o DAD.

Tabela 2. Parâmetros de validação cromatográfica do método desenvolvido para a determinação de cafeína e trigonelina em amostras de cafés torrado e moído empregando UHPLC-DAD

Tempo (min)	Parâmetros de validação	Trigonelina	Cafeína
	Faixa dinâmica de trabalho (% m/m)	0,2 a 2,0	0,6 a 6,0
	Equação da reta	$y = 141026x - 2833,5$	$y = 369528x + 1097,9$
	Coefficiente de correlação linear, r	0,9999	0,9999
	Coefficiente de determinação, R ²	0,9996	0,9997
	Limite de detecção, LD (% m/m)	0,01	0,02
	Limite de quantificação, LQ (% m/m)	0,03	0,06
	Precisão [0,8; 2,5 %(m/m)] n=10(DPR%)	0,12	0,55
	Precisão intermediária, n=6 (DPR%)	0,52	1,14
Exatidão (% de recuperação)	[0,2; 0,6 %(m/m)]	92,50	109,05
	[1,2; 3,0 %(m/m)]	96,70	104,10
	[2,0; 6,0 %(m/m)]	100,50	96,00

DPR - desvio padrão relativo.

A robustez do método cromatográfico foi avaliada para variações: na proporção do gradiente da fase móvel em $\pm 1,0\%$ da composição dos solventes A e B; de ± 5 °C da temperatura da coluna; e utilizando-se o solvente B de diferentes marcas (J. T. Baker e Fischer, ambos grau HPLC).

2.6. Aplicação

Aplicou-se o método desenvolvido em 20 amostras de café torrado e moído comerciais, obtidas em mercados da região de Londrina (Paraná), visando sua futura aplicação em análises de rotina de controle de qualidade.

2.7. Determinação de umidade

Para caracterização das amostras e cálculo da concentração dos componentes em base seca, avaliou-se a umidade das amostras de café torrado e moído utilizando analisador de umidade com lâmpada halógena (OHAUS-MB 45, Parsippany, EUA). Na determinação, utilizou-se programação de modo normal a 105 °C durante 7 minutos,

empregando 2,000 g de amostra e considerando-se 0,01 g, como diferença de perda de massa (DIAS, 2005; MARCUCCI et al., 2013). As análises foram realizadas em triplicata.

2.8. Extração de trigonelina e cafeína

Para o preparo das amostras de cafés comerciais, adaptou-se as condições de extração da ISO 20481:2008. Após a determinação da umidade, pesou-se o equivalente a 0,50000 g de amostra, em base seca, em balança analítica (AX200, Shimadzu, Quioto, Japão). Foram adicionados às amostras 2,00 g de óxido de magnésio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 100,00 mL de água ultrapura em Erlenmeyer de 500 mL. A massa do Erlenmeyer, juntamente com as massas da amostra, do MgO e da água foram anotadas (massa inicial). Fechou-se o frasco com a mistura, homogeneizou-se e aqueceu-se em chapa aquecedora (NT339, Nova Técnica, Piracicaba-SP) até a fervura por 20 minutos, sendo homogeneizadas a cada 5 minutos. Após o resfriamento, pesou-se o frasco

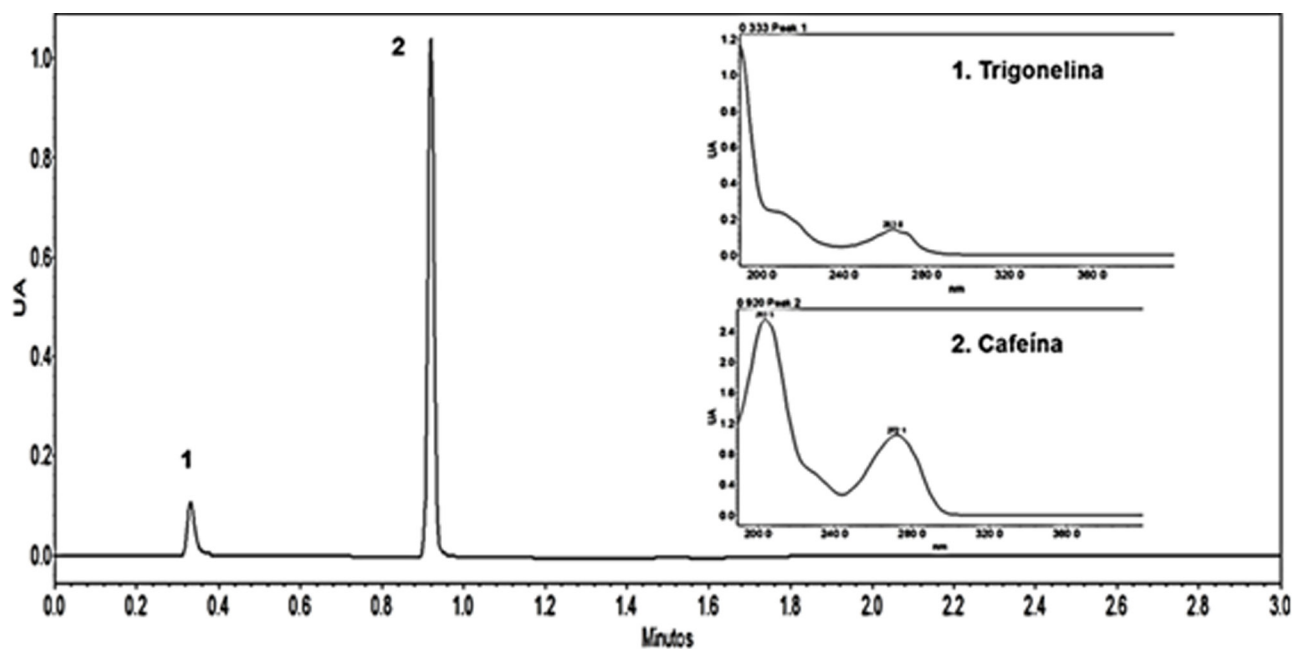


Figura. 1. Cromatograma dos padrões de trigonelina 0,5 % (m/m) (pico 1) e cafeína 2,0 % (m/m) (pico 2) com seus respectivos espectros de absorção molecular empregando UHPLC-DAD.

novamente e adicionou-se a água apenas para recompor a massa, perdida por evaporação. O extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo e o sobrenadante passado em membrana de acetato celulose 0,22 μm (Sartorius Stedim, Göttingen, Alemanha) para ser injetado no sistema cromatográfico.

3. Resultados e discussão

A Figura 1 apresenta um cromatograma obtido a partir do método proposto para uma mistura de padrões de trigonelina e cafeína em concentrações próximas às encontradas em amostras de café, 0,5 % (m/m) e 2,0 % (m/m), respectivamente.

Pode-se observar, a partir da Figura 1, que o método proposto atende à proposta de rapidez, sendo que os dois analitos são detectados em menos de 1 minuto, sendo os tempos de retenção da trigonelina e cafeína de 0,33 e 0,93 minutos, respectivamente. A parte final do cromatograma de 1 a 3 min corresponde às etapas de limpeza e reequilíbrio das condições iniciais das proporções das fases móveis (Tab. 1). O método foi desenvolvido visando sua aplicação em todos os tipos de equipamento de UHPLC, tanto nos que fazem a mistura da fase móvel à base de volume quanto à base de tempo. Porém, esta etapa pode ser otimizada diminuindo o tempo de análise para 1,5 min, empregando um sistema de UHPLC binário, como deste trabalho, em virtude do seu menor volume morto. O mesmo vale para a etapa de gradiente. O método cromatográfico proposto pode ser considerado o mais rápido encontrado na literatura para detecção simultânea dos dois compostos, sem assimetria de picos, com elevada resolução e sensibilidade. Comparativamente, o método proposto por O' Driscoll (2014) (11) apresentou tempos de retenção para trigonelina de 1,00 e para a cafeína de 6,46 minutos, apresentando em média tempo de análise 5 vezes maior.

O método foi validado de acordo com a RE 899/2003 da ANVISA e as figuras de mérito da validação do método estão apresentadas na Tabela 2.

O método desenvolvido mostrou-se: linear ($r > 0,99$) na faixa dinâmica de trabalho proposta para a trigonelina (0,2 a 2,0 % (m/m) (Fig. 2a) e para a cafeína (0,6 a 6,0% (m/m) (Fig. 2b); apresentando limites de detecção e quantificação adequados, considerando as concentrações das amostras de cafés torrado e moído comerciais; preciso (DPR<1%) com dados aleatorizados, sem tendência e, com baixa dispersão nos gráficos de resíduos (Fig. 2c e 2d); e exato, com uma taxa de recuperação média para as concentrações de ambos os compostos na ordem de 99,80%, considerando-se os três níveis de concentração: baixo, médio e alto.

A especificidade e seletividade foram avaliadas pelo perfil dos espectros de absorção dos analitos (Fig. 3) nos tempos de retenção de 0,33 min para a trigonelina e em 0,93 min para cafeína. As especificidade e seletividade do método foram também confirmadas pela adição de padrão na amostra, onde os picos dos analitos tiveram suas áreas acrescidas proporcionalmente à concentração dos padrões adicionados. Uma vez que os dois analitos apresentam comprimentos máximos de absorção relativamente próximos, a análise dos dois analitos foi realizada em 272 nm, sem prejuízo de sensibilidade para a trigonelina, com comprimento de absorção máximo de 264 nm. O método mostrou-se robusto frente às variações aplicadas de proporção de fase móvel ($\pm 1\%$), temperatura da coluna ($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$), e variação de 2 marcas de acetonitrila, apresentando taxas de recuperação adequadas, próximas a 100% e, portanto, dentro da faixa recomendada pela ANVISA, de 70 a 120%.

Após a validação do método realizou-se a análise de 20 amostras de cafés torrado e moído comerciais dos tipos superior, tradicional e extraforte, adquiridas em supermercados da região metropolitana de Londrina – PR, visando observar a aplicabilidade do método proposto em análises de rotina para estes analitos (Fig. 3).

Os espectros de absorção dos analitos trigonelina e cafeína das amostras analisadas (Fig. 3b e 3c) foram comparados com os espectros dos padrões analíticos (Fig. 1) a fim de se observar possíveis indícios de coeluição

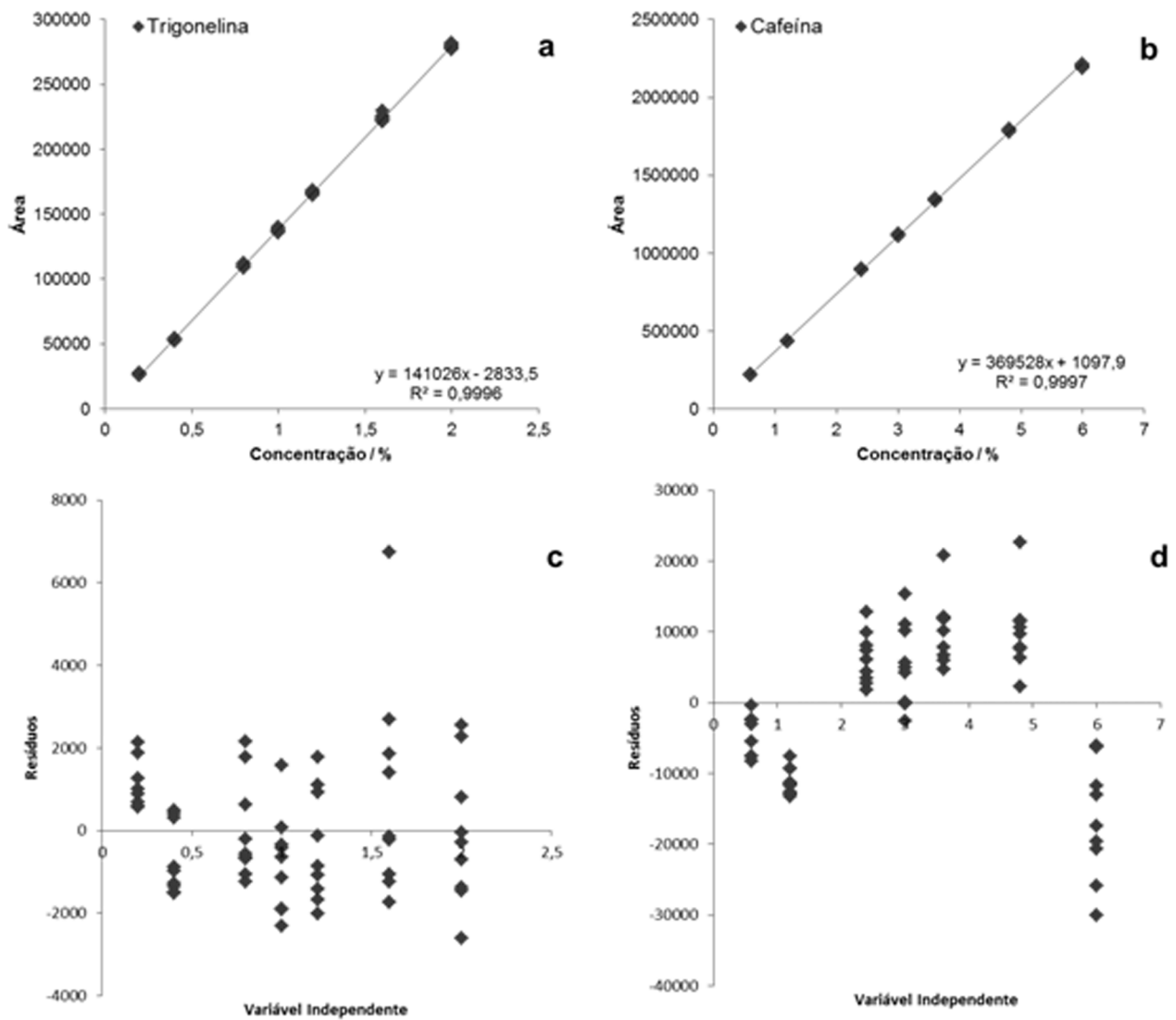


Figura. 2. Curvas analíticas (a, b) e análises de resíduos (c, d) para trigonelina e cafeína.

de picos cromatográficos pela modificação ou surgimento de novas bandas de absorção. Pode se observar que em ambos os casos os espectros foram idênticos, indicando ausência de coeluições que poderiam ser ocasionadas por possíveis interferentes nas matrizes amostrais. Os resultados de quantificação das amostras comerciais estão apresentados na Tabela 3.

Dentre as amostras analisadas (Tab. 3), observou-se que houve elevada variação de trigonelina e cafeína, com concentrações entre 0,03 - 1,07%(m/m) e 1,11 -

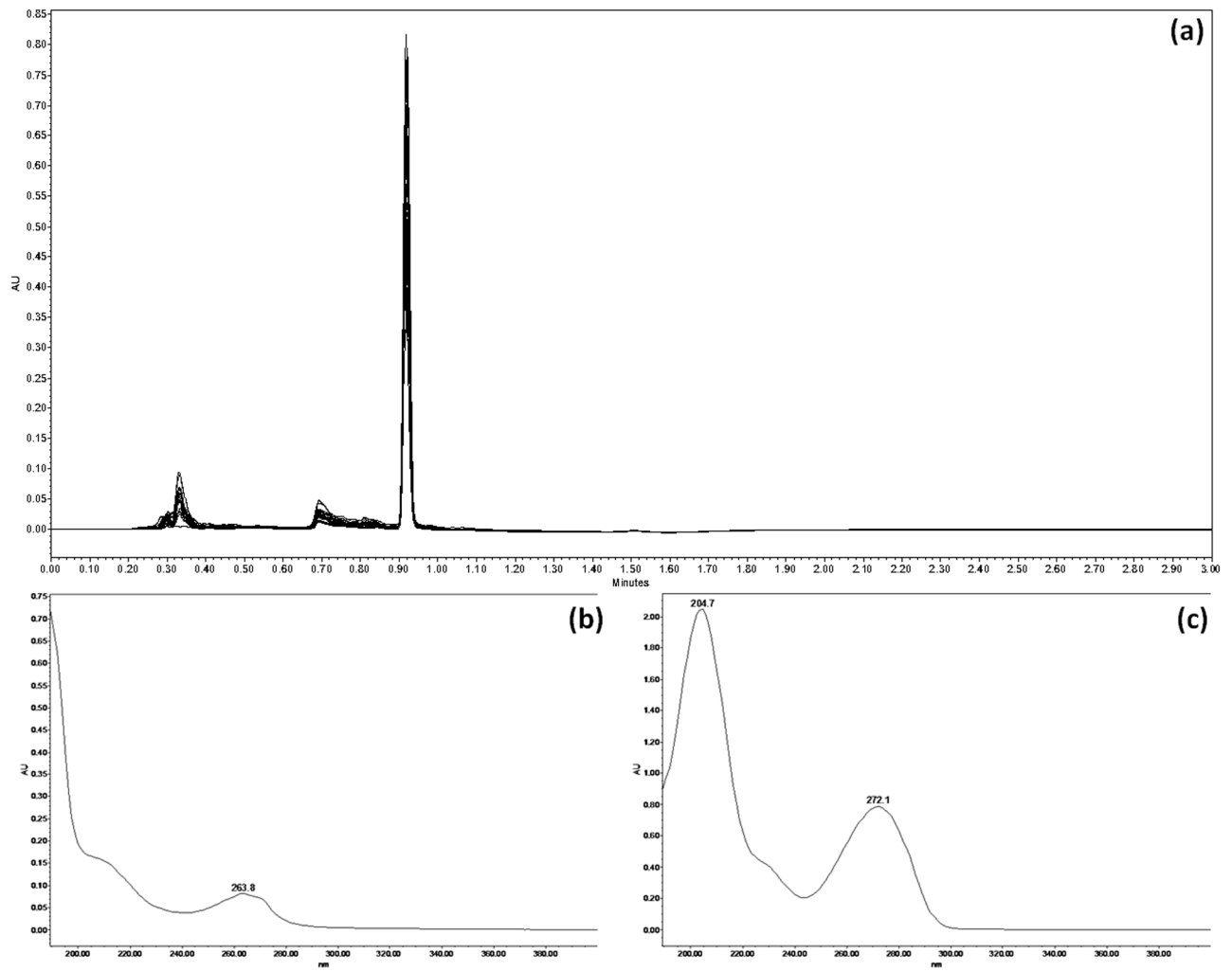


Figura 3. (a) Cromatogramas referentes às análises de 20 amostras de cafés torrado e moído comerciais com seus respectivos espectros de absorção dos analitos (b) trigonelina e (c) cafeína, visando verificar a aplicabilidade do método em análises de rotina de controle de qualidade.

Tabela 3. Concentração de trigonelina e cafeína nas 20 amostras de cafés comerciais analisadas

Amostra	Tipo	Trigonelina (n = 2)		Cafeína (n = 2)	
		Media (%) ± DP	CV (%)	Media (%) ± DP	CV (%)
1	EF	0,65 ± 0,00	0,00	2,33 ± 0,01	0,36
2	EF	0,14 ± 0,00	0,00	1,61 ± 0,00	0,00
3	EF	0,29 ± 0,00	0,00	1,64 ± 0,00	0,00
4	EF	0,14 ± 0,00	2,48	1,61 ± 0,01	0,39
5	NI	0,03 ± 0,00	0,00	1,12 ± 0,00	0,00
6	EF	0,40 ± 0,00	0,00	1,75 ± 0,00	0,00
7	T	0,34 ± 0,00	0,00	2,08 ± 0,00	0,00
8	T	0,51 ± 0,01	2,36	1,11 ± 0,00	0,38
9	EF	0,49 ± 0,02	3,74	1,59 ± 0,00	0,00
10	S	0,41 ± 0,01	2,41	1,60 ± 0,00	0,04
11	T	0,34 ± 0,00	0,00	1,75 ± 0,00	0,00
12	T	0,62 ± 0,02	3,42	1,54 ± 0,00	0,05
13	T	0,36 ± 0,01	1,62	1,77 ± 0,00	0,00
14	T	0,40 ± 0,00	0,00	1,69 ± 0,00	0,00
15	NI	0,40 ± 0,00	1,23	1,70 ± 0,08	5,00
16	T	0,54 ± 0,00	0,00	1,49 ± 0,00	0,00
17	NI	0,37 ± 0,01	1,91	1,12 ± 0,01	0,82
18	G	1,07 ± 0,00	0,00	1,67 ± 0,00	0,00
19	NI	0,36 ± 0,00	0,00	1,75 ± 0,00	0,00
20	G	1,04 ± 0,05	4,78	1,41 ± 0,02	1,20

Informações na embalagem - T: tradicional; EF: extraforte; S: superior; NI: não informada; G: Gourmet.

2,33%(m/m), respectivamente, indicando, que a maioria das amostras são compostas por *blends* de café arábica e café robusta (conilon).

4. Conclusão

O método analítico desenvolvido para análise de trigonelina e cafeína nas matrizes de cafés comerciais por UHPLC-DAD foi considerado rápido, seletivo, preciso, linear, com limites de detecção e quantificação

adequados e robusto, garantido a quantificação dos compostos com confiabilidade na faixa de concentração analítica dos cafés torrado e moído comerciais.

Agradecimentos

À CAPES pelo UPLC-DAD-MS/MS – Projeto AUX-PE-NANOBIOTEC-710/2009 - PROCESSO. no. 23038.019085/2009-14; pelas bolsas de doutorado do

Programa de Pós-Graduação de Química Associação
UEL-UEPG-Unicentro; e pelas bolsas de IC concedidas
pelo Projeto PROCAD/2013 – Processo no. 3007/2014.

Referências

- [1] Nogueira M, Trugo LC. Distribuição de Isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafês solúveis brasileiros, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2003; 23(2): 296-299.
- [2] Chung MC, Silva ATA, Castro LF, Guido RVC, Nassute JC, Ferreira, EI. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 2005; 41 (2): 28036.
- [3] Perrone D, Marino Donangelo C, Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem*, 2008; 110: 1030-1035.
- [4] Alves RC, Casal S, Oliveira B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? *Quim. Nova*, 2009; 32 (8): 2169-2180.
- [5] Jesus JS. Determinação e identificação de impurezas em café torrado e moído em Anápolis – GO [Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Exatas e Tecnológicas]. Anápolis: Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UNUCET); 2014.
- [6] International Coffee Organization (ICO). Londres [atualizado em 30 ago. 2017]. Disponível em: <http://www.ico.org/>
- [7] Marcucci CT, Benassi MT, Almeida MB, Nixdorf SL. Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafês solúveis comerciais brasileiros. *Quím. Nova*, 2013; 36 (4): 544-548.
- [8] Associação Brasileira da Indústria De Café (ABIC). Rio de Janeiro [atualizado em 29 ago. 2017a]. História do café. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>.
- [9] Associação Brasileira da Indústria De Café (ABIC). Rio de Janeiro [atualizado em 29 ago. 2017b]. Espécies de café. Disponível em: <http://www.abic.com.br>.
- [10] Associação Brasileira da Indústria De Café (ABIC). Rio de Janeiro [atualizado em 29 ago. 2017c]. Café e composição química. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=279>.
- [11] O’Driscoll DJ. Analysis of coffee bean extracts by use of ultra-performance liquid chromatography coupled of quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *MethodsX*, 2014; 1: 264–268.
- [12] Cheng ZX, Wu JJ, Liu ZQ, Lin N. Development of a hydrophilic interaction chromatography-UPLC assay to determine trigonelline in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study. *Chin. J. Nat. Medicines*, 2013; 11 (2): 164–170.
- [13] Meyer S, Dunkel A, Hofmann T. Sensomics-Assisted Elucidation of the Tastant Code of Cooked Crustaceans and Taste Reconstruction Experiments. *J. Agric. Food Chem.* 2016; 64: 1164–1175.