



DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CAFEÍNA, TRIGONELINA E ÁCIDO CLOROGÊNICO EM CAFÉS FERMENTADOS: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

DETERMINACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE CAFEÍNA, TRIGONELINA Y ÁCIDO CLOROGÉNICO EN CAFÉS FERMENTADOS: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

DETERMINATION OF CAFFEINE, TRIGONELLINE, AND CHLOROGENIC ACID CONTENTS IN FERMENTED COFFEES: VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD BY HPLC

Apresentação: Comunicação Oral

Isabel Cristina Freitas Feitosa¹; Jade Cecília de Souza Américo²; Wanessa Braz da Silva³; Elisandra Rabêlo da Silva⁴; Suzana Pedroza da Silva⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/VIICIAGRO.0154>

RESUMO

O café é uma matriz alimentícia complexa, cuja qualidade química e funcional pode ser influenciada por fatores como espécie, cultivo e principalmente processamento pós-colheita. Entre os compostos bioativos de maior relevância destacam-se a cafeína, a trigonelina e o ácido clorogênico, associados ao perfil sensorial, à atividade antioxidante e às propriedades funcionais da bebida. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo validar um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) para a determinação simultânea de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em cafés fermentados torrados, bem como avaliar o efeito de diferentes tempos de fermentação natural anaeróbica sobre os teores desses compostos. Os frutos de café foram coletados no município de Taquaritinga do Norte, em Pernambuco, lavados, selecionados e submetidos à fermentação anaeróbica em temperatura ambiente, nos tempos de 24 e 48 horas. Após a fermentação, os grãos foram secos, torrados a 190 °C por 15 minutos, moídos, padronizados granulometricamente, para os extratos foi realizado em água destilada a 90–92 °C. As análises foram realizadas em sistema HPLC com detector PDA, coluna C18, fase móvel composta por metanol e ácido fórmico 0,3% (30:70, v/v), fluxo de 2,0 mL/min e tempo de corrida de 5 minutos. O método apresentou desempenho satisfatório, com coeficientes de determinação superiores a 0,99, limites de detecção e quantificação compatíveis com as concentrações das amostras, coeficientes de variação inferiores a 1,39% e recuperações entre 93,5 e 105,0%. A amostra fermentada por 24 horas apresentou os menores teores dos três compostos, enquanto a fermentação por 48 horas promoveu aumento nos teores de cafeína e trigonelina em relação à TFN24, além do maior teor de ácido clorogênico. Conclui-se que o método validado é adequado para a quantificação dos compostos bioativos estudados e que o tempo de fermentação pode modular a composição química do café torrado.

¹ Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, isabel.cristina@ufape.edu.br

² Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, jade.americo@ufape.edu.br

³ Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, wanessa.braz09@gmail.com

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, elisandra.rabelos@ufape.edu.br

⁵ Dra. em Eng. Química, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, suzana.pedroza@ufape.edu.br

Palavras-Chave: Café fermentado, compostos bioativos, cromatografia líquida, validação analítica.

RESUMEN

El café es una matriz alimentaria compleja, cuya calidad química y funcional puede ser influenciada por factores como especie, cultivo y, principalmente, procesamiento poscosecha. Entre los compuestos bioactivos relevantes se destacan la cafeína, la trigonelina y el ácido clorogénico, asociados al perfil sensorial, actividad antioxidante y propiedades funcionales de la bebida. En este contexto, el trabajo tuvo como objetivo validar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE/HPLC) para la determinación simultánea de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico en cafés fermentados tostados, así como evaluar el efecto de diferentes tiempos de fermentación natural anaeróbica sobre los contenidos de estos compuestos. Los frutos de café fueron recolectados en el municipio de Taquaritinga do Norte, en Pernambuco, lavados, seleccionados y sometidos a fermentación anaeróbica a temperatura ambiente, durante 24 y 48 horas. Después de la fermentación, los granos fueron secados, tostados a 190 °C durante 15 minutos, molidos, estandarizados granulométricamente, y los extractos fueron preparados en agua destilada a 90-92 °C. Los análisis fueron realizados en sistema HPLC con detector PDA, columna C18, fase móvil compuesta por metanol y ácido fórmico 0,3% (30:70, v/v), flujo de 2,0 mL/min y tiempo de corrida de 5 minutos. El método presentó desempeño satisfactorio, con coeficientes de determinación superiores a 0,99, límites de detección y cuantificación compatibles con las concentraciones de las muestras, coeficientes de variación inferiores a 1,39% y recuperaciones entre 93,5 y 105,0%. La muestra fermentada por 24 horas presentó los menores contenidos de los tres compuestos, mientras la fermentación por 48 horas promovió aumento en los contenidos de cafeína y trigonelina respecto a TFN24, además del mayor contenido de ácido clorogénico. Se concluye que el método validado es adecuado para cuantificar compuestos bioactivos estudiados y que el tiempo de fermentación puede modular la composición química del café tostado.

Palabras Clave: Café fermentado, compuestos bioactivos, cromatografía líquida, validación analítica.

ABSTRACT

Coffee is a complex food matrix whose chemical and functional quality can be influenced by factors such as species, cultivation, and mainly post-harvest processing. Among the most relevant bioactive compounds, caffeine, trigonelline, and chlorogenic acid stand out, being associated with the sensory profile, antioxidant activity, and functional properties of the beverage. In this context, this study aimed to validate an analytical method by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the simultaneous determination of caffeine, trigonelline, and chlorogenic acid in roasted fermented coffees, as well as to evaluate the effect of different anaerobic natural fermentation times on the contents of these compounds. The coffee fruits were collected in the municipality of Taquaritinga do Norte, in Pernambuco, washed, selected, and subjected to anaerobic fermentation at room temperature for 24 and 48 hours. After fermentation, the beans were dried, roasted at 190 °C for 15 minutes, ground, granulometrically standardized, and the extracts were prepared in distilled water at 90–92 °C. The analyses were performed in an HPLC system with a PDA detector, C18 column, mobile phase composed of methanol and 0.3% formic acid (30:70, v/v), flow rate of 2.0 mL/min, and run time of 5 minutes. The method showed satisfactory performance, with determination coefficients above 0.99, detection and quantification limits compatible with the sample concentrations, coefficients of variation below 1.39%, and recoveries between 93.5 and 105.0%. The sample fermented for 24 hours showed the lowest contents of the three compounds, whereas fermentation for 48 hours promoted an increase in caffeine and trigonelline contents in relation to TFN24, in addition to the highest chlorogenic acid content. It is concluded that the validated method is suitable for the quantification of the bioactive compounds studied and that fermentation time can modulate the chemical composition of roasted coffee samples in the evaluated sample set.

Keywords: Fermented coffee, bioactive compounds, liquid chromatography, analytical validation.

INTRODUÇÃO

O café é um produto de expressiva relevância econômica global, cuja qualidade é determinada por múltiplos fatores, como à espécie, variedade, condições edafoclimáticas, processamento pós-

colheita, torrefação e preparo da bebida. Entre essas etapas, o processamento pós-colheita exerce papel determinante na diferenciação do perfil sensorial e da composição química dos grãos, uma vez que pode promover alterações em compostos associados ao aroma, sabor, acidez, amargor e propriedades funcionais do produto final (Pereira; Moreira, 2021; Silva *et al.*, 2024).

Nesse contexto, a fermentação tem se destacado como uma estratégia tecnológica capaz de modificar a qualidade do café. Quando conduzida de forma controlada, a fermentação microbiana pode favorecer o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis, entretanto, quando realizada sem controle adequado, pode comprometer a qualidade da bebida (Palacios; Huayama, 2023; Souza, 2021). Dentre as técnicas emergentes, a Fermentação Anaeróbica Autoinduzida (FAAI), também conhecida como Self-Induced Anaerobic Fermentation (SIAF), tem recebido atenção crescente por seu potencial de promover transformações bioquímicas controladas na composição química do café, especialmente nos compostos bioativos (Braga, 2022; Pereira *et al.*, 2022; Vale *et al.*, 2023).

O café apresenta uma complexa matriz de compostos bioativos, entre os quais se destacam a cafeína, a trigonelina e o ácido clorogênico (ACG), que desempenham papel fundamental na formação das características sensoriais durante a torra e nas propriedades funcionais da bebida. A cafeína, principal alcaloide do café, é responsável pelo efeito estimulante e contribui para o sabor amargo, a trigonelina atua como precursora de compostos voláteis aromáticos durante a torrefação e os ácidos clorogênicos constituem a principal fração fenólica do grão cru, com elevada atividade antioxidante e influência sobre a acidez e a adstringência da bebida (Farah; Ferreira; Vieira, 2019; Konstantinidis *et al.*, 2023).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) é amplamente empregada para a separação, identificação e quantificação de compostos em matrizes complexas, devido à sua sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade (Oliveira, 2016; Pires, 2023). Entretanto, métodos analíticos aplicados à determinação de compostos bioativos em café ainda podem apresentar limitações relacionadas ao tempo de corrida, ao custo operacional e à ausência de validação formal, fatores que podem comprometer a confiabilidade e a comparabilidade dos resultados. No Brasil, a validação de métodos analíticos é orientada por diretrizes como a RDC nº 166/2017 (ANVISA, 2017) e pelo DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020), que estabelecem os parâmetros de desempenho mínimos exigidos para métodos quantitativos em matrizes alimentícias.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo validar um método analítico por HPLC para a determinação simultânea de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em cafés, bem como quantificar esses compostos em amostras de café torrado submetidas a diferentes tempos de fermentação anaeróbica autoinduzida. Com isso, busca-se contribuir para a obtenção de dados analíticos confiáveis

e para a compreensão dos efeitos do processamento fermentativo sobre o perfil bioativo do café.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Fermentação anaeróbica autoinduzida e qualidade do café

No processamento do café, o fruto pode ser fermentado inteiro ou despulpado, sendo a mucilagem residual essencial para a ocorrência do processo, que pode se dar de forma induzida ou espontânea, em condições aeróbicas ou anaeróbicas (Barbosa *et al.*, 2025; Alves *et al.*, 2020). A fermentação anaeróbica destaca-se por utilizar o metabolismo de microrganismos para a degradação da mucilagem, cascas e da polpa do café. Esse processo pode envolver espécies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis* e *Torulaspora delbrueckii*, sendo realizado em condições controladas que favorecem a estabilidade microbiológica e a qualidade final do produto (Kornman, 2019; Souza, 2021; Braga, 2022).

A Fermentação Anaeróbica Autoinduzida (FAAI), também conhecida como Self-Induced Anaerobic Fermentation (SIAF), ocorre em sistemas fechados, nos quais a anaerobiose é estabelecida gradualmente pelo consumo de oxigênio pelos microrganismos e pela liberação de dióxido de carbono. Nessas condições, bactérias lácticas, leveduras e outros microrganismos metabolizam os açúcares presentes na mucilagem, produzindo ácidos orgânicos, álcoois, ésteres e outros metabólitos capazes de migrar para o interior do grão e modificar seu perfil químico e sensorial (Cassimiro *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2022; Vale *et al.*, 2023).

Compostos bioativos do café e seu comportamento durante o processamento

A distribuição de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico desempenham papel fundamental na formação das características sensoriais durante a torra. Ao longo do processamento fermentativo é fundamental para avaliar esses compostos para entender o impacto da fermentação na qualidade do produto. A atividade microbiana pode modificar o perfil desses compostos tanto no grão cru quanto no torrado (Braga, 2022; Vale *et al.*, 2023).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é o alcaloide majoritário do café. Por ser termoestável, a cafeína permanece praticamente inalterada durante a torrefação, exceto por pequena perda por sublimação (Farah; Ferreira; Vieira, 2019; Braga, 2022). No contexto da fermentação, estudos indicam que parte da cafeína pode ser lixiviada para o líquido fermentativo, especialmente em processos por via úmida, com perda estimada de até 40% em algumas condições de processamento (Campos *et al.*, 2020).

A trigonelina (ácido N-metilnicotínico) é o segundo alcaloide mais abundante no café, atua como precursora de compostos formados durante a torra. Por ser termosensível, sofre degradação

térmica e origina compostos como nicotinamida, pirróis, alquilpiridinas e outros heterocíclicos voláteis, relacionados ao aroma e ao sabor do café. A intensidade dessa degradação depende das condições de torrefação, especialmente tempo e temperatura, fazendo com que a trigonelina também seja considerada um indicador químico associado ao grau de torra (Alcantara, 2019; Konstantinidis *et al.*, 2023; Zhong *et al.*, 2024).

Os ácidos clorogênicos (ACG) constituem a principal fração de compostos fenólicos do café e estão associados à atividade antioxidante, acidez, amargor e adstringência da bebida. Durante a torrefação, parte dos ácidos clorogênicos é degradada por reações de pirólise e hidrólise, originando lactonas, ácido cafeico, ácido quínico e outros compostos fenólicos de menor massa molecular, que também contribuem para o perfil sensorial da bebida (Cangussu, 2017; Farah; Ferreira; Vieira, 2019; Tsai; Jioe, 2021). Estudos demonstram que torras mais claras preservam maior proporção de ACG, o que influencia diretamente o perfil antioxidante do café (Rusinek *et al.*, 2025).

HPLC e validação analítica para compostos bioativos em café

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) é uma técnica amplamente empregada para a análise de compostos bioativos em café, por sua capacidade de separar, identificar e quantificar simultaneamente analitos de diferentes classes químicas em matrizes complexas (Oliveira, 2016; Pires, 2023). A escolha da fase estacionária, da fase móvel, do fluxo e do comprimento de onda de detecção são parâmetros críticos que determinam a seletividade, a sensibilidade e o tempo de análise do método. A metodologia proposta por Perrone, Donangelo e Farah (2008), por exemplo, é uma referência frequentemente utilizada para quantificação desses analitos em café, sendo adaptada conforme as condições instrumentais e os objetivos do estudo.

Entretanto, adaptações em métodos cromatográficos exigem validação experimental de desempenho. A validação de métodos analíticos visa demonstrar que o método produz resultados confiáveis e adequados ao propósito pretendido, com critérios que variam conforme a técnica (ICH, 2023; Pires, 2023).

No Brasil, os critérios para validação de métodos analíticos são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio da RDC nº 166, que exige a validação de métodos não descritos em compêndios oficiais, considerando as condições técnico-operacionais do laboratório (ANVISA, 2017). Para análises de alimentos, destacam-se também as diretrizes do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, que orientam a avaliação de parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez e incerteza de medição (INMETRO, 2020).

METODOLOGIA

A pesquisa caracteriza-se como quantitativa e experimental, pois envolve a obtenção de dados numéricos por meio da análise cromatográfica de compostos presentes em grãos de café submetidos a processos controlados de fermentação e torrefação. O campo de pesquisa compreendeu propriedades rurais localizadas no Agreste de Pernambuco, bem como os laboratórios, situados na Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE). Os sujeitos da pesquisa corresponderam aos frutos e grãos de café utilizados como material experimental. Os instrumentos e procedimentos empregados envolveram etapas de coleta, fermentação, torrefação, preparo das amostras, análise por HPLC e tratamento estatístico dos dados, conforme descrito nos tópicos seguintes.

Coleta, processo de fermentação e torrefação dos grãos de café

Os frutos do café da espécie *Coffea arabica*, variedade *Arabica typica*, colhidos manualmente no município de Taquaritinga do Norte em Pernambuco. O café colhido passou pelo processo de lavagem e seleção. As fermentações foram realizadas no Laboratório de Processos e Inovação em Café (LAPIC) que fica localizado no prédio SLAP e as análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos (LAAL) localizado no prédio SLCTAL na Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE). Os frutos inteiros de café selecionados foram processados por via úmida. As fermentações ocorreram em temperatura ambiente (25 °C), de modo anaeróbico, com coleta de amostras nos tempos de 24 e 48 h (Ferreira *et al.*, 2024). Em reatores de polietileno tereftalato (PET) com capacidade de 5 L, acoplados com válvulas airlock tipo S, utilizou-se 2,0 kg de frutos e 2,17 L de água destilada. O café fermentado foi lavado em água corrente, seco em estufa de circulação de ar forçada (aproximadamente 30–35 °C) até atingir umidade de 11–12%. Em seguida, uma parte dos grãos foi submetida ao processo de torrefação por convecção em torrador a ar (Cefpotie, JMS-210, China), utilizando-se cerca de 100 g de café cru, a 190 °C por 15 minutos, com resfriamento posterior de 5 minutos. Os grãos de café torrados foram moídos em moedor manual com lâminas cônicas (Timemore C2 Chestnut, China) e padronizados em peneiras de Tyler para uma granulometria de 0,5 mm (32 mesh).

Condições cromatográficas para análise dos compostos: trigonelina, cafeína e ácido clorogênico

O cromatógrafo é do modelo Accela (Thermo Scientific), detector PDA (UV-VIS), Bomba Accela 600 pump, amostrador automático e coluna C -18 (Thermo Scientific, Hypersil GOLD C18, 250 x 4,6 mm) utilizado nas condições de comprimentos de onda de 272 nm para detecção de trigonelina e cafeína e 320 nm para ácido clorogênico. A melhor metodologia que se adequou foi a proposta por Perrone, Donangelo e Farah (2008), com modificações no fluxo, na concentração da fase móvel e no tempo da corrida. Os cálculos foram efetuados considerando-se as áreas dos picos.

O Quadro 01 apresenta as condições cromatográficas utilizadas no estudo.

Quadro 01: Condições cromatográficas do método.

Condições cromatográficas	
Gradiente	Isocrático
Temperatura da coluna	40 °C
Fase móvel	metanol e solução aquosa de ácido fórmico 0,3% (30:70, v/v)
Comprimento de onda	272 nm e 320 nm
Fluxo	2,0 mL/min
Corrida	5 minutos

Fonte: Própria (2026).

Construção da curva de calibração e figuras de mérito

Os padrões analíticos de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico foram adquiridos da Sigma-Aldrich, com pureza $\geq 98\%$. As soluções estoque foram preparadas por dissolução dos padrões nas concentrações de 11,5 $\mu\text{g/mL}$ (cafeína), 9,0 $\mu\text{g/mL}$ (trigonelina) e 14,0 $\mu\text{g/mL}$ (ácido clorogênico), armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e protegidas da luz. As soluções de trabalho foram obtidas por diluição seriada das soluções estoque, cobrindo a faixa de 0,50 a 11,50 $\mu\text{g/mL}$ para a cafeína (9 pontos), de 0,50 a 9,00 $\mu\text{g/mL}$ para a trigonelina (8 pontos) e de 2,19 a 14,00 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido clorogênico (8 pontos). Todas as soluções foram analisadas em triplicata para a construção das curvas analíticas.

Para a validação do método, foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Essas figuras de mérito, bem como suas respectivas condições, estão apresentadas no Quadro 02, conforme estabelecido na RDC nº 166 (ANVISA, 2017) e no DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020).

Quadro 02: Figuras de mérito utilizadas na validação do método analítico.

Figuras de mérito	Condições
Linearidade	A equação da reta, de acordo com a curva de cada composto $y = a + bx$ y: resposta medida da área do pico; x: concentração; a: coeficiente linear; b: coeficiente angular (sensibilidade).
Sensibilidade	$S = \frac{dy}{dx}$ S = sensibilidade; dy = variação da área; dx = variação da concentração.
Limite de detecção (LD)	$LD = 3,3\sigma/S$ LD = limite de detecção; σ = a partir do desvio padrão residual da linha de regressão; S = sensibilidade.

Limite de quantificação (LQ)	$LQ = 10\sigma/S$ LQ = limite de quantificação; σ = a partir do desvio padrão residual da linha de regressão; S = sensibilidade.
Precisão	$CV (\%) = (s/x) \times 100$ CV (%) = Coeficiente de Variação; s = desvio padrão dos resultados obtidos; x = média dos valores medidos.
Exatidão	Um modo de avaliar a exatidão do método é por meio do cálculo recuperação: $Recuperação(\%) = (X_{exp}/X_{ref}) \times 100$ X _{exp} = Concentração média experimental; X _{ref} = Concentração teórica.

Fonte: Adaptado de ANVISA (2017) e INMETRO (2020).

Preparo das amostras

Para o preparo do extrato, utilizou-se uma proporção de 1:10 (m/v), de 5 g de amostra de café, em 50 mL de água destilada a 90–92 °C por 3 minutos, seguida de filtração em papel de filtro quantitativo. O extrato obtido foi filtrado em filtro de seringa PVDF de 0,45 µm e acondicionado em vial de 1,5 mL. Os valores de concentração obtidos a partir do extrato foram corrigidos pelo fator de diluição, multiplicando-se a concentração lida (mg/mL) pelo fator 10 (mL/g), de modo que os resultados fossem referidos à massa original de café e expressos em mg/g, para detecção da trigonelina e cafeína foi realizada uma diluição de 1:40 e para detecção do ácido clorogênico houve uma diluição de 1:350.

Análise estatística dos dados

Os resultados das análises cromatográficas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo consideradas estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0,05$, para comparação das médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o Software Rstudio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linearidade, a sensibilidade analítica e os limites de detecção e quantificação foram avaliados para os compostos cafeína, trigonelina e ácido clorogênico, com o objetivo de verificar o desempenho do método cromatográfico empregado. Os parâmetros obtidos, incluindo as equações das curvas analíticas, os coeficientes de determinação (R^2), os coeficientes angulares, os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ), calculados a partir do desvio padrão residual e da inclinação das curvas analíticas (ANVISA, 2017), estão apresentados na Tabela 01.

Tabela 01: Parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação para os compostos analisados.

Composto	Equação da reta	R ²	S (inclinação)	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Cafeína	$y = 3,2632x - 0,3309$	0,9990	3,2632	0,4140	1,2546
Trigonelina	$y = 2,4918x - 1,8887$	0,9960	2,4918	0,6685	2,0258
Ácido clorogênico	$y = 0,4682x + 0,5188$	0,9994	0,4681	0,3863	1,1707

S: sensibilidade analítica (coeficiente angular); LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

Fonte: Própria (2026).

O coeficiente de determinação (R²) obtido para a cafeína, trigonelina e ácido clorogênico foi superior a 0,99, indicando excelente ajuste linear entre a concentração do analito e a resposta do detector, conforme o critério da RDC nº 166 (ANVISA, 2017). A trigonelina apresentou o maior LD (0,6685 µg/mL), reflexo de sua menor sensibilidade relativa em comparação à cafeína. O ácido clorogênico exibiu o menor LD (0,3863 µg/mL), resultado consistente com o reportado por Perrone, Donangelo e Farah (2008) para métodos similares. É importante destacar que, em todos os casos, as concentrações dos analitos nas amostras reais de café torrado situaram-se muito acima dos LQs estabelecidos, na faixa de µg/mL, confirmando que o método opera bem dentro de seu intervalo linear e que os resultados de quantificação são plenamente confiáveis.

A precisão do método, avaliada pela repetibilidade em três níveis de concentração (baixo, médio e alto), está apresentada na Tabela 02. Os coeficientes de variação (CV%) obtidos foram inferiores a 1,39% em todas as condições avaliadas, abaixo do critério máximo de 5,3% estabelecido pela AOAC (2016) para analitos na faixa de µg/mL.

Tabela 02: Precisão para validação das metodologias analíticas para detecção de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico, em 3 níveis de concentrações.

Composto	Níveis	Concentração (µg/mL)	Média	DP	CV%
Cafeína	Baixo	0,50	1,6228	0,0175	1,0784
	Médio	6,00	19,4329	0,0239	0,1230
	Alto	11,50	37,0979	0,0269	0,0725
Trigonelina	Baixo	0,50	0,0566	0,0004	0,7067
	Médio	4,14	8,2979	0,0255	0,3073
	Alto	9,00	20,5804	0,2858	1,3887
Ácido clorogênico	Baixo	2,19	0,5624	0,0033	0,5868
	Médio	7,25	2,8612	0,0141	0,4928

Alto	14,00	6,0592	0,0099	0,1634
------	-------	--------	--------	--------

Fonte: Própria (2026).

A tendência de redução do CV% com o aumento da concentração, observada para os três analitos, é um comportamento esperado em métodos cromatográficos, pois em níveis mais elevados a relação sinal/ruído é mais favorável, resultando em maior estabilidade da resposta instrumental. Os valores de CV% inferiores a 1,5% em todos os níveis atestam excelente repetibilidade do método, indicando que as etapas de preparo de amostra, injeção e detecção são reprodutíveis e adequadas para a análise rotineira de cafés fermentados.

A exatidão, avaliada pelo percentual de recuperação em três níveis de concentração (Tabela 03), considerando o nível baixo acima do limite de quantificação, com isso variou de 93,6 a 99,8% para a cafeína, de 93,5 a 101,0% para a trigonelina e de 99,9 a 105,0% para o ácido clorogênico. Todos os valores encontram-se dentro do intervalo de 80 a 110% recomendado pela AOAC (2016) para analitos na faixa de µg/mL em matrizes alimentícias.

Tabela 03: Exatidão para validação das metodologias analíticas para detecção de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico, em 3 níveis de concentrações.

Composto	Nível	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)
Cafeína	Baixo	1,71	1,60	93,60
	Médio	6,00	6,06	101,00
	Alto	11,50	11,48	99,83
Trigonelina	Baixo	2,93	2,74	93,50
	Médio	4,14	4,08	98,55
	Alto	9,00	9,09	101,00
Ácido clorogênico	Baixo	2,19	2,30	105,00
	Médio	7,25	7,24	99,86
	Alto	14,00	14,03	100,20

Fonte: Própria (2026).

A recuperação ligeiramente abaixo de 100% observada no nível baixo de cafeína (93,6%) e trigonelina (93,5%) pode ser atribuída a efeitos de matriz, especialmente a supressão de sinal causada por compostos co-eluídos presentes na matriz complexa do café torrado, e à menor razão sinal/ruído nessa faixa de concentração, fenômeno amplamente reportado na literatura para métodos HPLC-PDA em matrizes de origem vegetal (Pires, 2023). Os valores de recuperação superiores a 100% observados para o ácido clorogênico nos três níveis (99,9–105,0%) refletem a expressiva atividade dos compostos fenólicos da matriz no reagente e a possível contribuição de isômeros de ácido

clorogênico co-eluídos no mesmo tempo de retenção, comportamento reportado por Perrone, Donangelo e Farah (2008) e considerado aceitável dentro dos critérios regulatórios vigentes.

Os teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico nas amostras de café torrado estão apresentados na Tabela 04. O tempo de fermentação influenciou de forma distinta a concentração dos três compostos, com diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

Tabela 04: Teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em amostras de café torrado submetidas a diferentes tempos de fermentação natural.

Amostra	Cafeína (mg/g)	Trigonelina (mg/g)	Ácido clorogênico (mg/g)
TFN0	3,95 ± 0,03 ^a	2,20 ± 0,02 ^a	27,91 ± 0,02 ^b
TFN24	2,37 ± 0,02 ^c	1,26 ± 0,01 ^c	21,14 ± 0,07 ^c
TFN48	3,68 ± 0,06 ^b	2,11 ± 0,02 ^b	32,19 ± 0,09 ^a

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Códigos das amostras: TFN0 – café torrado sem fermentação; TFN24 – café torrado com fermentação de 24 horas; TFN48 – café torrado com fermentação de 48 horas.

Fonte: Própria (2026).

Os teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico variaram entre as amostras de café torrado submetidas aos diferentes tempos de fermentação natural, evidenciando alterações na composição química dos grãos.

A amostra TFN24 apresentou as menores concentrações dos três compostos em relação ao controle TFN0, com reduções de 40,0% para cafeína, 42,7% para trigonelina e 24,3% para ácido clorogênico. Esse comportamento pode estar associado à lixiviação e à redistribuição de compostos solúveis durante a fermentação, uma vez que a presença de água e mucilagem favorece alterações químicas e bioquímicas na matriz do grão. Durante o processamento úmido, a atividade microbiana e enzimática pode contribuir para a acidificação do meio, favorecendo a migração de compostos para o líquido fermentativo (Campos *et al.*, 2020). Assim, a redução observada em TFN24 pode estar relacionada a um período de maior mobilização desses compostos, especialmente por lixiviação e modificações estruturais na matriz.

Para a cafeína, os teores variaram de 2,37 ± 0,02 a 3,95 ± 0,03 mg/g, sendo o maior valor observado na amostra TFN0 e o menor em TFN24. Embora a cafeína apresente relativa estabilidade térmica durante a torra, o processamento pode influenciar os compostos, principalmente pela fermentação em meio aquoso. A redução observada em TFN24 pode estar relacionada à maior solubilização e migração parcial desse composto. Por outro lado, a amostra TFN48 apresentou aumento em relação à TFN24, sugerindo que o prolongamento da fermentação pode ter alterado sua disponibilidade na matriz do grão.

Os teores de trigonelina variaram de $1,26 \pm 0,01$ mg/g em TFN24 a $2,20 \pm 0,02$ mg/g em TFN0. A redução observada após 24 horas de fermentação pode estar associada à maior susceptibilidade desse composto às alterações promovidas pelo processamento, incluindo lixiviação e possíveis transformações em meio ácido. Além disso, por ser termolábil, a trigonelina é degradada durante a torra, originando nicotinamida e compostos voláteis, como pirróis e alquilpiridinas, associados ao desenvolvimento do aroma do café (Konstantinidis *et al.*, 2023; Zhong *et al.*, 2024). A diferença entre TFN24 e TFN48 indica que o tempo de fermentação pode interferir na retenção da trigonelina antes da etapa de torrefação.

Em relação ao ácido clorogênico, os teores variaram de $21,14 \pm 0,07$ mg/g em TFN24 a $32,19 \pm 0,09$ mg/g em TFN48. A menor concentração em TFN24 pode estar relacionada à lixiviação e a possíveis reações de hidrólise durante a fermentação. Já o maior teor observado em TFN48, superior ao controle TFN0, sugere que a fermentação prolongada pode ter favorecido a liberação ou maior extração de frações fenólicas anteriormente menos disponíveis. Esse comportamento pode estar associado a alterações estruturais promovidas pela fermentação, capazes de modificar a interação dos compostos fenólicos com a parede celular e favorecer sua extração em meio aquoso (Pereira *et al.*, 2022; Vale *et al.*, 2023).

A torra clara também deve ser considerada na interpretação dos resultados, uma vez que tende a preservar maiores teores de ácido clorogênico quando comparada a torras mais intensas. A literatura relata que torras prolongadas ou severas promovem maior degradação desses compostos e sua conversão em derivados, como lactonas, reduzindo sua concentração final no café torrado (Tsai; Jioe, 2021; Rusinek *et al.*, 2025). Dessa forma, os valores observados neste estudo podem refletir a combinação entre fermentação natural e torra clara, com destaque para a amostra TFN48, que apresentou maior teor de ácido clorogênico.

De modo geral, os resultados indicam que a fermentação natural influenciou os teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico no café torrado, sendo o tempo de 24 horas associado às maiores reduções e o tempo de 48 horas ao aumento da disponibilidade desses compostos, especialmente do ácido clorogênico.

CONCLUSÕES

A otimização e a validação do método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência permitiram estabelecer uma metodologia para a determinação simultânea de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em café torrado. O tempo de corrida de cinco minutos, aliado ao desempenho obtido nas figuras de mérito avaliadas, torna o método adequado para estudos que exigem a análise de um grande número de amostras e a comparação entre diferentes condições de processamento. A

possibilidade de quantificar os três compostos em uma única corrida representa um avanço metodológico importante, pois reduz o tempo de análise e favorece o acompanhamento das alterações químicas relacionadas às etapas pós-colheita do café.

A aplicação do método nas amostras submetidas à fermentação anaeróbica autoinduzida demonstrou que o tempo de fermentação exerce influência específica sobre os compostos bioativos do café torrado. As respostas distintas observadas entre os períodos avaliados indicam que o prolongamento do processo não resulta em uma tendência linear de aumento ou redução dos compostos, evidenciando a complexidade das transformações químicas e bioquímicas ocorridas durante a fermentação. Esse comportamento indica que o tempo de fermentação não deve ser compreendido apenas como um parâmetro operacional, mas como uma variável capaz de alterar de forma seletiva a composição química do café torrado.

Nesse sentido, contribui tanto para o aperfeiçoamento das análises cromatográficas aplicadas ao café quanto para a compreensão dos efeitos da fermentação sobre sua composição química. O método validado poderá ser utilizado no acompanhamento de diferentes processos fermentativos, permitindo avaliar com maior segurança as modificações associadas aos compostos bioativos. Os resultados destacam a importância da aplicação de controle analítico às escolhas tecnológicas adotadas durante o processamento, especialmente em estudos voltados à padronização e qualidade de café.

Como continuidade deste trabalho, indica-se ampliar os tempos de fermentação avaliados e acompanhar as alterações químicas nos grãos crus e torrados. A relação dos resultados cromatográficos com análises sensoriais e de atividade antioxidante permitirá compreender melhor seus efeitos sobre a qualidade da bebida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio concedido à realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ALCANTARA, G. M. R. N. **Comparação das espécies químicas não voláteis entre cafés especiais e tradicionais**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020. DOI: 10.11606/D.11.2020.tde-24032020-094916.

ALVES, E. A. *et al.* Efeito da fermentação sobre qualidade da bebida do café robusta (*Coffea canephora*) cultivado na Amazônia ocidental. **Revista Ifes Ciência**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 159-170, 2020. DOI: 10.36524/ric.v6i3.875.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 166** - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 24 jul. 2017.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Appendix F. Gaithersburg: AOAC International, 2016.

BARBOSA, P. T. *et al.* Evaluation of the influence of the type of post-harvest processing and roasting operation on the physicochemical characteristics of Arabica coffee beans. **Food Measure** 19, 6815–6827 (2025). <https://doi.org/10.1007/s11694-025-03416-1>

BRAGA, A. V. U. **Estudo da fermentação anaeróbia induzida em café**. 2022. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2022.

CAMPOS, G. A. *et al.* Comparison of Batch and Continuous Wet-Processing of Coffee: Changes in the Main Compounds in Beans, By-Products and Wastewater. **Foods** 2020, 9, 1135. <https://doi.org/10.3390/foods9081135>

CANGUSSU, L. B. **Caracterização dos compostos bioativos presentes em cascas de café da espécie *Coffea arabica***. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

CASSIMIRO, D. M. J. *et al.* Coinoculation of lactic acid bacteria and yeasts increases the quality of wet fermented Arabica coffee. **International Journal of Food Microbiology**, v. 369, p. 109627, 2022. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109627.

DIAS, S. R. *et al.* Aumento da qualidade e complexidade da fermentação do café despulpado com *Lactiplantibacillus plantarum* e leveduras selecionadas. **Eur Food Res Technol** 251, 283–297 (2025). <https://doi.org/10.1007/s00217-024-04640-7>

FARAH, A.; FERREIRA, T.; VIEIRA, A. C. Coffee: production, quality and chemistry. London: The Royal Society of Chemistry, 2019. p. 565-627. ISBN: 978-1-78262-004-4.

FERREIRA, T.; SHULER, J.; GUIMARÃES, R.; FARAH, A. Introduction to coffee plant and genetics. In: FARAH, A. (ed.). **Coffee: production, quality and chemistry**. London: Royal Society of Chemistry, 2019.

FERREIRA, L. J. C., BERTARINI, P. L. L., DO AMARAL, L. R., GOMES, M. S., DE OLIVEIRA, L. M., & SANTOS, L. D. Coinoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state and submerged coffee fermentation: Influences on chemical and sensory compositions. **LWT**, p. 116299, 2024.

ICH. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. **ICH Q2(R2): validation of analytical procedures**. Geneva: ICH, 2023.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **DOQ-CGCRE-008** -

Orientação sobre validação de métodos analíticos. Brasília: INMETRO, jun. 2020.

JIMENEZ, E. J. M. **Fermentação anaeróbica autoinduzida (SIAF) com e sem inoculação de leveduras: viabilidade da semente, composição química e qualidade sensorial do café.** 2023. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2023.

KONSTANTINIDIS, N. *et al.* Risk Assessment of Trigonelline in Coffee and Coffee By-Products. **Molecules** 2023, 28, 3460. <https://doi.org/10.3390/molecules28083460>

KORNMAN, C. A guide to carbonic maceration and anaerobic fermentation in coffee. **Daily Coffee News**, 2019.

LINDSEY, Z. R. *et al.* Caffeine content in filter coffee brews as a function of degree of roast and extraction yield. **Scientific Reports** 14, 29126 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-80385-3>

LOPES, P. S. F.; MATA, S. F.; RIBEIRO, K. D. Qualidade da bebida do café sob diferentes tempos de fermentação induzida. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 32-41, 2024. DOI: 10.30681/rcaa.v21i1.10649.

MOON, S. A. *et al.* Influence of Post-Harvest Processing and Drying Techniques on Physicochemical Properties of Thai Arabica Coffee. **AgriEngineering** 2024, 6, 2198-2213. <https://doi.org/10.3390/agriengineering6030129>

OLIVEIRA, E. M. **A coluna de cromatografia líquida na indústria farmacêutica: uso, controles e descarte.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

PALACIOS, F.; HUAYAMA, P. Análisis sensorial del café catimor (*Coffea arabica*) inoculado con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en dos sistemas de fermentación. **Revista Científica Pakamuros**, v. 11, n. 1, p. 123-130, jan./mar. 2023.

PEREIRA, L. L.; MOREIRA, T. **Quality determinants in coffee production.** Cham: Springer International Publishing, 2021.

PEREIRA, T. S. *et al.* Self-induced anaerobiosis coffee fermentation: impact on microbial communities, chemical composition and sensory quality of coffee. **Food Microbiology**, v. 103, p. 103962, 2022. DOI: 10.1016/j.fm.2021.103962.

PIRES, F. C. **Implementação e validação de um método para a determinação de cafeína em diferentes gêneros alimentícios com o uso de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).** 2023. Dissertação (Mestrado) – Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2023.

PERRONE D., DONANGELO C. M., FARAH A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. **Food Chem.** 2008 Oct 15;110(4):1030-5. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.012. Epub 2008 Mar 18. PMID:26047298.

RIBEIRO, B. B. *et al.* Avaliação química e sensorial de blends de *Coffea canephora* Pierre e *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, v. 9, n. 2, p. 178-186, 2014.

RUSINEK, R. *et al.* Effect of climate, growing region, country of origin, and post-harvest processing on the of content chlorogenic acids (CGAs) and aromatic compounds in roasted coffee beans. **Scientific Reports** 15, 30117 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-16126-x>

SILVA, L. C. F. *et al.* Enhancing sensory quality of coffee: the impact of fermentation techniques on *Coffea arabica* cv. Catiguá MG2. **Foods**, v. 13, n. 5, p. 653, 2024. DOI: 10.3390/foods13050653.

SILVA, M. N. **Validação de método de dissolução com quantificação por HPLC de cápsulas de cloridrato de tramadol com e sem adição de enzima.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Análise Instrumental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

SOARES, W. L. *et al.* Qualidade do café arábica por diferentes granulometrias. **Ciência Agrícola**, Rio Largo, v. 17, n. 1, p. 31-35, 2019. DOI: 10.28998/rca.v17i1.6495.

SOUZA, A. S. **Fermentação do café em diferentes tempos e processos.** 2021. 39 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências Agrárias, Rio Paranaíba, 2021. DOI: 10.47328/ufvcrp.2022.004.

TSAI, C. F.; JIOE, I. P. J. The Analysis of Chlorogenic Acid and Caffeine Content and Its Correlation with Coffee Bean Color under Different Roasting Degree and Sources of Coffee (*Coffea arabica* Typica). **Processes** 2021, 9, 2040. <https://doi.org/10.3390/pr9112040>

URBAN, P. L. Clarifying misconceptions about mass and concentration sensitivity. **Journal of Chemical Education**, v. 93, n. 6, p. 984–987, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00986>.

VALE, A. S. *et al.* Compreendendo os efeitos da fermentação anaeróbica autoinduzida na qualidade dos grãos de café: estudos microbiológicos, metabólicos e sensoriais. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 37, 2023. DOI: 10.3390/foods12010037.

ZHONG, J. J. *et al.* Cation-exchange/hydrophilic interaction mixed-mode liquid chromatographic method for analyzing the trigonelline class of bioactives in coffee beans. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 128, p. 106011, 2024. DOI: 10.1016/j.jfca.2024.106011