



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LEONEL VINICIUS CONSTANTINO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES  
LIVRES EM CAFÉ VERDE**

**LEONEL VINICIUS CONSTANTINO**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES  
LIVRES EM CAFÉ VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientadora:** Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf

Londrina  
2013

LEONEL VINICIUS CONSTANTINO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES LIVRES EM  
CAFÉ VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para à obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf  
(QUI/CCE/UEL)

---

Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi  
(DCTA/CCA/UEL)

---

Profa. Dra. Maria Josefa Santos Yabe  
(QUI/CCE/UEL)

Londrina, 14 de fevereiro de 2013.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, à minha orientadora e amiga Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf pelo conhecimento repassado. Obrigado pelo carinho, paciência, atenção e confiança em mim depositada, que contribuiu grandiosamente com a minha formação profissional e pessoal.

A CAPES, pelo apoio financeiro, concedendo a Bolsa, sem a qual não poderia ter realizado este trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, em especial ao técnico Nelson, pela disponibilidade das incubadoras de bancada com agitação orbital.

Ao Laboratório de Espectroscopia de Emissão e Absorção Atômica (LEEAA), pela disponibilidade da centrífuga e do sistema extrator de microondas.

Ao Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária (LAPA), e ao técnico João, pela ajuda oferecida na operação do cromatógrafo.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), na pessoa da Dra. Brígida, pela ajuda na aquisição das amostras e disponibilidade dos recursos de seu laboratório.

Em especial, às estagiárias Bárbara e Cyntia pela disponibilidade, ajuda e amizade, que foram de grande importância para este trabalho.

Aos amigos dos laboratórios DIA, LEEAA e LAPA, pelo companheirismo e momentos agradáveis de descontração dentro e fora da UEL.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Química, pelos ensinamentos, convivência e por trilharem junto comigo esta etapa importante da minha vida.

A Deus, por ter me dado a oportunidade de vivenciar todas essas experiências pessoais e profissionais que levarei durante minha vida.

À minha família, por acreditarem em meus sonhos e jamais medirem esforços para que eu os realizasse.

CONSTANTINO, Leonel Vinícius. **Desenvolvimento e validação de um método cromatográfico para análise de açúcares livres em café verde**. 2013. 58 fls. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## RESUMO

Na pesquisa é imprescindível a busca de novas técnicas e aplicações instrumentais, que permitam avaliar a composição dos alimentos de forma confiável, eficiente e ágil. Considerando que o café é a 2ª *commodity* mundial, atrás somente do petróleo, em sendo o Brasil, o 1º mercado exportador e o 2º mercado consumidor, constitui-se de fundamental importância, a busca por novos métodos de caracterização desta matriz. Neste sentido, a determinação do teor de carboidratos destaca-se, considerando que, no grão verde, estas moléculas estão intimamente ligadas à maturação fisiológica, que contribui para uma melhora na qualidade sensorial do produto final. Contudo, observa-se que há escassez de métodos analíticos, especialmente quanto à etapa de extração na literatura, para os grãos “in natura”. Para isto, neste trabalho foram determinadas as concentrações de sacarose, glicose e frutose do café verde. Para garantir resultados confiáveis, quanto à quantificação destes açúcares livres, desenvolveu-se e validou-se um método empregando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando água como fase móvel e coluna de troca catiônica, acoplado ao detector de índice de refração (HPLC-RID). O método mostrou-se seletivo e preciso, para os três carboidratos estudados, com desvios padrão relativos (DPR < 2,0%) para a repetitividade, e para precisão intermediária (DPR < 3,0%). Os coeficientes de correlação apresentaram linearidade ( $r > 0,999$ ); em ampla faixa dinâmica de trabalho: de 0,0625 a 100,0 g L<sup>-1</sup> para a sacarose, e de 0,0625 a 150,0 g L<sup>-1</sup> para glicose e frutose; com limite de detecção de 0,020 g L<sup>-1</sup>. Avaliou-se o desempenho para extração dos açúcares da matriz por duas técnicas – extração assistida por microondas (MAE) e agitação orbital. O estudo utilizou planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, com triplicata do ponto central. A influência das 4 variáveis empregadas no processo de extração: técnica instrumental; tempo de extração; temperatura de extração e quantidade amostral, foi avaliada em 2 níveis para cada variável, um inferior e um superior, em relação ao estabelecido. Os resultados foram comparados pela diferença entre as concentrações médias, determinadas pelo somatório dos 3 açúcares. A taxa de recuperação média para sacarose, glicose e frutose foi respectivamente de 97,33; 97,34 e 99,19 % usando o microondas; e de 97,97; 95,81 e 97,76 % empregando a agitação orbital. Considerando a extração, as melhores condições de análise com os maiores rendimentos foram obtidos com o uso da agitação orbital, confirmada: pelos perfis cromatográficos com melhor resolução entre os açúcares de interesse; pela independência da quantidade amostral; e pela maior homogeneidade de distribuição normal no gráfico das probabilidades acumuladas.

**Palavras-chaves:** Frutose. Glicose. Sacarose. Extração. HPLC.

CONSTANTINO, Leonel Vinícius. **Development and validation of a chromatographic method for free sugars analysis of green coffee beans.** 2013. 52 f. Dissertation (MSc in Chemistry) - State University of Londrina, Londrina.

## ABSTRACT

In researches to assess the composition of foods in a reliable way, efficiently, and quickly it is essential find new instrumental techniques, methods and applications. As coffee be the 2nd worldwide commodity commercialized, behind only of oil, and by the fact that Brazil is ranked as number one exporter and detent the 2nd consumer market, the searching for new methods of characterization of this matrix is of fundamental importance. In this sense, determination of carbohydrate content stands out in green beans due to these molecules be closely linked to physiological maturity, which contributes to an improved sensory quality of the final product. However, analytical methods are scarce in literature, especially concerning sample preparation describing extraction procedure of sugars in green coffee beans. So, with this purpose, this study determined the concentrations of sucrose, glucose and fructose of the green coffee. To ensure reliable results, the quantification of sugars, was done by developed and validated method that employed an high performance liquid chromatography system using water as the mobile phase and cation exchange column, coupled to a refractive index detector (HPLC -RID). The method for the three carbohydrates studied, proved to be selective and precise, with low relative standard deviations to repeatability (RSD < 2.0%) and for intermediate precision (RSD<3.0%). The correlation coefficients showed linearity ( $r > 0.999$ ) in a wide dynamic range of work: from 0.0625 to 100.0 g L<sup>-1</sup> for sucrose, and 0.0625 to 150.0 g L<sup>-1</sup> for glucose and fructose, with a detection limit of 0.020 g L<sup>-1</sup>. The performance for extracting sugars from the matrix by two techniques - microwave assisted extraction (MAE) and orbital shaking was evaluated. The study used a factorial design 2<sup>4</sup> with triplicate center point. The influence of the four variables used in the extraction process: instrumental technique, extraction time, extraction temperature and sample amount, was valued at two levels for each variable, a lower and a higher, relative to established. The results were compared by the difference between the average concentrations, determined by the sum of the 3 sugars. The average recovery rate for sucrose, glucose and fructose was 97.33, 97.34 and 99.19% respectively using the microwave, and 97.97, 95.81 and 97.76% using the orbital shaking. Considering the extraction, the best analysis conditions with the highest yields were obtained with the use of orbital shaking, confirmed: by chromatographic profiles with better resolution between the sugars of interest, not depending on the amount of sample, and by greater homogeneity of cumulative probabilities of the normal distribution graph.

**Key words:** Fructose. Glucose. Sucrose. Extraction, HPLC

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Principais constituintes do café verde.....	14
<b>Tabela 2</b>	– Composição de aldoses, em solução aquosa, no equilíbrio .....	20
<b>Tabela 3</b>	– Valores de $pK_a$ dos açúcares estudados em solução aquosa .....	20
<b>Tabela 4</b>	– Fatores e seus respectivos níveis para extração empregando microondas e agitação orbital (200 rpm).....	30
<b>Tabela 5</b>	– Planejamento fatorial ( $2^4 + 3$ ) para os experimentos de extração empregando microondas e agitação orbital em 2 níveis, variando: as técnicas extrativas (Fator 1); o tempo de extração (Fator 2); a temperatura (Fator 3) e a massa de amostra (Fator 4).....	30
<b>Tabela 6</b>	– Parâmetros cromatográficos para avaliação do desempenho da coluna na separação de picos .....	33
<b>Tabela 7</b>	– Precisão calculada pela repetitividade da mistura do padrão analítico $10 \text{ g L}^{-1}$ , injetados sob as mesmas condições ( $n = 7$ ).....	35
<b>Tabela 8</b>	– Recuperação dos ensaios submetidos às técnicas de extração por microondas e agitação orbital, conforme o planejamento fatorial $2^4$ , com triplicata no ponto central (PC).....	37
<b>Tabela 9</b>	– Recuperação dos ensaios submetidos às técnicas de extração por microondas e agitação orbital, conforme o planejamento fatorial $2^4$ , com triplicata no ponto central (PC).....	39
<b>Tabela 10</b>	– Resultados obtidos, a partir do planejamento fatorial $2^4$ com triplicata no ponto central.....	41
<b>Tabela 11</b>	– Intervalos de confiança dos efeitos principais e de interação, para um planejamentos fatorial $2^4$ , a partir da extração por microondas .....	44
<b>Tabela 12</b>	– Intervalos de confiança dos efeitos principais e de interação, para um planejamentos fatorial $2^4$ , a partir da extração por agitação orbital .....	44
<b>Tabela 13</b>	– Probabilidade acumulada da distribuição normal dos efeitos do planejamento fatorial para microondas.....	46
<b>Tabela 14</b>	– Probabilidade acumulada da distribuição normal dos efeitos do planejamento fatorial para agitação orbital .....	46
<b>Tabela 15</b>	– Intervalo de confiança obtidos pelo teste t-pareado para os tratamentos submetidos ao microondas .....	50
<b>Tabela 16</b>	– Intervalo de confiança obtidos pelo teste t-pareado para os tratamentos submetidos a agitação orbital .....	50

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estruturas químicas de polissacarídeos presentes nos grãos de café: (A) galactomanano, (B) arabinogalactano e (C) xiloglucano..... 14
- Figura 2** – Estruturas químicas da (a) sacarose; (b)  $\alpha$  e  $\beta$  D-glicose; (c) D-frutose, nas formas  $\alpha$  e  $\beta$  furanosídicas; (d) D-frutose, nas formas  $\alpha$  e  $\beta$  piranosídicas ..... 20
- Figura 3** – Cromatograma ilustrativo dos parâmetros cromatográficos ..... 21
- Figura 4** – Etapas do processo de extração aquoso de carboidratos em café verde por microondas agitador orbital ..... 31
- Figura 5** – Cromatograma do padrão de açúcares 10 g L<sup>-1</sup> da mistura de (1) sacarose, (2) glicose e (3) frutose, com tempos de retenção em 8,9; 10,6 e 17 minutos, respectivamente ..... 32
- Figura 6** – Cromatograma da injeção da água ultrapura mostrando ausência de picos interferentes nos tempos de retenção da sacarose (8,9 min.); glicose (10,6 min) e frutose (17 min) ..... 34
- Figura 7** – Curvas analíticas para sacarose levantadas em 3 diferentes dias sob as mesmas condições de análises, demonstrando a precisão intermediária do método ..... 35
- Figura 8** – Curvas analíticas para glicose levantadas em 3 diferentes dias sob as mesmas condições de análises, demonstrando a precisão intermediária do método ..... 36
- Figura 9** – Curvas analíticas para frutose levantadas em 3 diferentes dias sob as mesmas condições de análises, demonstrando a precisão intermediária do método ..... 36
- Figura 10** – Curva analítica empregada na quantificação da sacarose ..... 39
- Figura 11** – Curva analítica empregada na quantificação da glicose..... 40
- Figura 12** – Curva analítica empregada na quantificação da frutose..... 40
- Figura 13** – Cromatograma de carboidratos livres na amostra de café verde, sem submeter as técnicas de microondas e agitação orbital (Ensaio 15 - Condição: 90 min; 60°C; 500,0 mg). Picos: (1) sacarose; (2) glicose e (3) frutose ..... 42

<b>Figura 14</b> – Cromatograma de carboidratos livres na amostra de café verde, extraído por microondas (Ensaio <b>16</b> - Condição: 90 min; 60°C; 500,0 mg). Picos: (1) sacarose; (2) glicose e (3) frutose .....	43
<b>Figura 15</b> – Cromatograma de carboidratos livres na amostra de café verde, extraído por agitação orbital (Ensaio <b>16</b> - Condição: 90 min; 60°C; 500,0 mg). Picos: (1) sacarose; (2) glicose e (3) frutose .....	43
<b>Figura 16</b> – Gráficos das probabilidades acumuladas para os 15 efeitos obtidos do tratamento experimental (a) microondas e (b) agitação orbital.....	47
<b>Figura 17</b> – Gráficos normais para os 15 efeitos obtidos do tratamento experimental (a) microondas e (b) agitação orbital.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>RID</b>	Refraction Index Detector
<b>IAPAR</b>	Instituto Agronômico do Paraná
<b>LABDIA</b>	Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica
<b>MAE</b>	Microwave Assisted Extraction
<b>UEL</b>	Universidade Estadual de Londrina
<b>LAPA</b>	Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	27
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	28
3.1 AMOSTRA.....	28
3.2 REAGENTES .....	28
3.3 EQUIPAMENTOS.....	29
3.4 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	29
3.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA EM HPLC-IR.....	31
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
4.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	32
4.1.1 Cromatograma dos Açúcares Livres e Parâmetros Cromatográficos .....	32
4.1.2 Seletividade do Método .....	34
4.1.3 Precisão (Repetitividade).....	34
4.1.4 Linearidade e Faixa Dinâmica de Trabalho .....	35
4.1.5 Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) .....	37
4.1.6 Precisão Intermediária.....	37
4.1.7 Taxa de Recuperação .....	38
4.2 PLANEJAMENTO FATORIAL E TRATAMENTO MATEMÁTICO .....	40
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

O café é reconhecido mundialmente e, sua bebida é bastante apreciada e consumida, destacando-se como um dos produtos de maior comercialização no mercado internacional. O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de grãos de café (ABIC, 2012). Portanto, estudos relacionados à composição do café, detecção de fraudes e avaliação de sua qualidade são indiscutivelmente importantes (DE MARIA, MOREIRA, TRUGO, 1999).

A qualidade do café depende da interação entre fatores desde a pré até a pós-colheita, que garantirão ao grão, as características de sabor e aroma desejados. Dessa forma, observa-se a grande importância em se elaborar cafés de qualidade, desde a etapa de produção na lavoura, até a sua comercialização (FRANCA, MENDONÇA, OLIVEIRA, 2005).

Segundo a ANVISA (1978), o café cru, ou café em grão, é a semente beneficiada do fruto maduro de diversas espécies do gênero *Coffea*, o qual deve ser constituído pela semente da drupa madura, procedente de espécimes vegetais genuínos (*Coffea arabica*, *Coffea liberica* e *Coffea robusta*) convenientemente lavada, dessecada e desprovida dos tegumentos externos. No presente trabalho, o café cru ou em grão é designado como café verde.

Segundo Vilela (1997), mesmo em regiões adequadas ao plantio de café, as condições adversas do clima em um dado ano; como elevadas precipitações, temperatura e umidade relativa do ar, durante as fases de floração, frutificação e amadurecimento; podem provocar perdas de qualidade devido à maturações desuniformes. Essas adversidades podem levar à presença de frutos, ainda verdes no momento da colheita, o que deprecia a qualidade do café; assim como a ocorrência de frutos muito maduros, acarretando fermentações indesejáveis, o que leva à perda de qualidade, até mesmo antes do início da colheita.

O fruto ideal para ser colhido é aquele que tenha completado o estágio de maturação fisiológica, que corresponde, no caso do café, ao denominado fruto cereja. Entretanto, o cafeeiro apresenta, na fase de maturação, frutos em diferentes estágios (verdes, cerejas, passas e secos), devido à característica desta espécie de produzir várias florações (BARTHOLO, GUIMARÃES, 1997).

A qualidade da bebida do café depende de inúmeros fatores, alguns já citados, entretanto a composição dos grãos de café verde é determinante. Muitos estudos têm sido conduzidos na tentativa de identificar a participação destes componentes na formação das características desejáveis de bebida. No entanto, a questão é complexa, já que a composição do café verde é influenciada por condições ambientais, práticas culturais e principalmente pela genética (SCHOLZ et al., 2000).

Os principais compostos que têm sido associados à qualidade da bebida do café são carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos clorogênicos, taninos hidrossolúveis, cafeína e trigonelina, sendo alguns deles formados após o processo de torra (AGRESTI et al., 2008; BANDEIRA et al., 2009). Os principais constituintes do grão de café verde estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Principais constituintes do grão de café verde

<b>Constituinte do grão</b>	<b>Teor presente no grão (%)</b>
<b>Açúcares</b>	7 – 30
<b>Lipídios</b>	13 – 20
<b>Água</b>	8 – 11
<b>Proteínas</b>	6 – 12
<b>Ácidos clorogênicos</b>	6 – 9
<b>Cafeína</b>	1 – 2,5
<b>Minerais</b>	3 – 4
<b>Celulose</b>	15 – 20

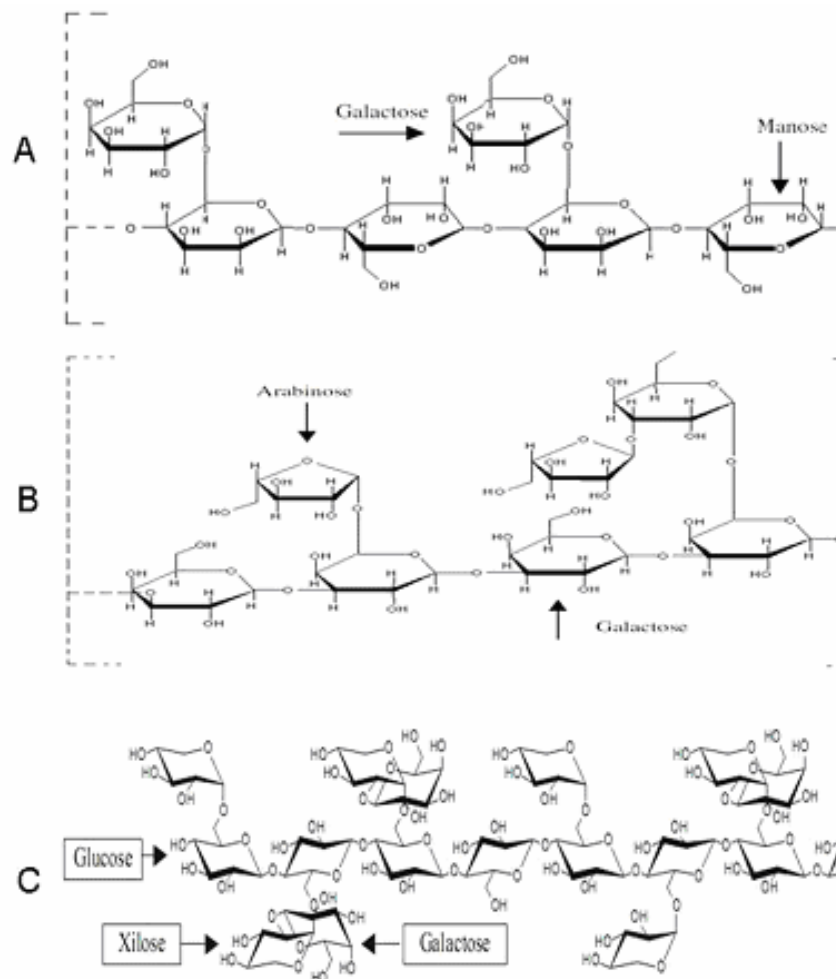
**Fonte:** Hoffmann (2001).

Os polissacarídeos da parede celular representam 50% do peso seco do grão de café verde e, estes, interferem na viscosidade do “café expresso”, e conseqüentemente na estabilidade do creme (SALVA, LIMA, 2007).

Os polissacarídeos consistem em três principais estruturas: mananos ou galactomananos, arabinogalactanos. Além disso, existem pequenas quantidades de pectinas e xiloglucano (FISCHER et al., 2001; REDGWELL, FISCHER, 2006). Os arabinogalactanos são depósitos de polímeros derivados das pectinas, enquanto os mananos e xiloglucanos são depósitos de polímeros de hemicelulose (BUCKERIDGE et al., 2000).

Os galactomananos são polissacarídeos compostos por uma cadeia linear de resíduos de manose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com resíduos de galactose (MARTINS et al., 2005). Os arabinogalactanos consistem em uma cadeia principal de galactose unidas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) com resíduos de arabinose e/ou galactose. Essas ligações são características de arabinogalactanos do tipo II, um polímero que geralmente está ligado covalentemente à proteína (MARTINS et al., 2005). Galactomananos juntamente com arabinogalactano correspondem a 80% (m/m) dos polissacarídeos presentes no grão de café (OOSTERVELD et al., 2003a). Os xiloglucanos apresentam uma cadeia principal de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano ramificada com ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) por resíduos de D-xilopiranosídeos ou  $\beta$ -D-galactopiranosídeo-(1 $\rightarrow$ 2)-D-xilopiranosídeos (BUCKERIDGE et al., 2000), sendo que este carboidrato junto com a celulose equivalem a 16% (m/m) dos polissacarídeos presentes no café (OOSTERVELD et al., 2003a). As estruturas de galactomanano, arabinogalactano e xiloglucano são mostradas na Figura 1.

**Figura 1** - Estruturas químicas de polissacarídeos presentes nos grãos de café: (A) galactomanano, (B) arabinogalactano e (C) xiloglucano



**Fonte:** Buckeridge et al.(2000); Delgado (2008).

Os açúcares são os carboidratos de baixa massa molar, que podem ser extraídos com água quente, e contribuem para a intensidade e balanceamento do “flavor” do café (MILO et al., 2001), sendo assim, são os responsáveis pelo impacto inicial do paladar da bebida.

Sacarose, glicose e frutose são os açúcares mais abundantes no endosperma dos cafés verdes arabica e robusta (ROGERS et al., 1999; TRUGO, 1985).

A sacarose é um dissacarídeo não redutor (não apresenta carbono anomérico - grupamentos aldeídicos e cetônicos livres) formado por uma unidade de D-glicose unida a uma unidade de D-frutose, através de uma ligação glicosídica.

Por outro lado, a D-glicose e D-frutose são açúcares redutores (que têm a capacidade de reduzir, na presença de agentes oxidantes, em meio alcalino), assim como os demais monossacarídeos (LEHNINGER, NELSON, COX, 2006).

Os açúcares solúveis (frutose, glicose, sacarose e sorbitol) têm importância na regulação osmótica e de transporte nas plantas. A dinâmica da água nos tecidos vegetais está muito relacionada com a dinâmica dos carboidratos solúveis (BUCKHOUT, TUBBE, 1996; RAVEN, EVERT, 2001). A mobilização dos açúcares solúveis é diretamente ligada aos eventos climáticos, principalmente temperatura, e tem grande importância nos estudos de adaptação de plantas.

Durante o início da maturação, a glicose e a frutose estão em maior quantidade, no grão de café, sendo que a concentração de glicose é duas vezes maior que a de frutose. Em café Arábica, os níveis de glicose (entre 8-12%, em peso seco) são maiores do que no café Robusta (entre 2 – 4%, em peso seco). No fim do desenvolvimento do grãos de café, a relação entre os açúcares se altera, e a glicose e frutose diminuem para 0,03% e 0,04%, respectivamente, enquanto a sacarose aumenta para 5 – 12% do peso seco (ROGERS et al., 1999).

A sacarose é o principal açúcar presente no café cru da espécie Arábica, e a sua concentração corresponde de 90 - 99% do total de açúcares livres quantificados. Nos cafés Robusta a variabilidade é maior, e a concentração de sacarose pode chegar a ser apenas 42% da concentração dos carboidratos solúveis totais (SILWAR, LÜLLMANN, 1988). Clifford (1975) e Trugo (1985) escreveram que os cafés Arábica contêm mais sacarose do que os cafés Robusta. Apesar da revisão de Trugo (1985) ter revelado que os cafés Robusta contêm mais açúcares redutores do que os cafés Arábica, os resultados obtidos por Silwar e Lüllmann (1988) evidenciaram que há variedades de café Robusta com teor de açúcares redutores inferior ao encontrado em cafés Arábica.

Noventa por cento da sacarose presente no grão cru são degradados por uma leve torra, e a degradação é completa no café com torra escura; nesse caso, os teores de sacarose serão muito pequenos, já que a sacarose é degradada à 130°C. Os polissacarídeos presentes no grão cru são bastante estáveis e resistem intactos à torração (SILVETZ, 1963).

Durante a torração, a sacarose é transformada em outros produtos, que são os responsáveis pela cor marrom do café torrado. Ela sofre inicialmente

desidratação, seguida de hidrólise, transformando-se em glicose e frutose, por causa da elevação de temperatura na pirólise. Esses são desidratados, polimerizados e parcialmente degradados à compostos orgânicos voláteis, água e gás carbônico, ou reagem com outros componentes do café, como aminoácidos e proteínas (SILVETZ, 1963).

Os açúcares solúveis, como a sacarose, glicose e frutose são importantes na nossa alimentação e estão presentes, principalmente, em sucos de frutas (DEMIATE et al., 2002).

Do ponto de vista tecnológico, a sacarose é bastante importante, pois é utilizada na produção de açúcar, para uso culinário e, sua fermentação é o precursor na produção de álcool combustível e bebidas (DEMIATE et al., 2002).

Descritas na literatura, existem diversas técnicas, entre clássicas e modernas, que podem ser empregadas na extração de analitos em uma matriz. Pode-se citar: a extração líquido-líquido (LLE), extração por soxhlet, extração em fase sólida (SPE), dispersão da matriz em fase sólida (MSDP), extração com fluido supercrítico (SFE), extração acelerada com solvente (ASE), extração com água subcrítica (SWE), e extração assistida por microondas (MAE). Temos ainda as técnicas miniaturizadas como, por exemplo, a microextração em fase sólida (SPME), extração por sorção em barra de agitação (SBSE), microextração por sorbente empacotado (MEPS) e microextração em fase líquida (LPME) (LANÇAS, 2004; ZWIR-FERENC, BIZIUK, 2006).

Na literatura consultada não foram encontrados muitos métodos analíticos, especialmente trabalhos que definam tipos de extratores e tempos de extração para determinação de açúcares em café. Segundo métodos de Lane Enyon, citados pela Association of Official Analytical Chemists (1990), o extrator usado para extração de açúcares em alimentos é o álcool etílico 70%. Porém, Chagas (1994) utilizou água destilada para extração em café cru, fazendo uso de agitação orbital por 1 hora, obtendo rendimentos de extração superiores aos do álcool. Vilas Boas et al. (2001), também obteve melhores rendimentos, utilizando água como extrator em diferentes tempos e temperaturas, porém para café torrado e moído.

Nos processos de extração líquido-sólido convencionais são utilizadas técnicas como agitação ou sonicação (DEAN, 1998). A agitação orbital é uma das técnicas, aplicadas na extração sólido-líquido mais utilizadas. Também

conhecida como incubadoras “*shaker*”, a técnica é comumente utilizada em diversas análises laboratoriais da indústria química, farmacêutica, de alimentos, universidades e centros de pesquisas. Ela consiste na movimentação orbital da bandeja, e como o equipamento é fechado, permite o controle da temperatura, além da programação da velocidade e tempo de agitação (PRODUTOS, 2013).

O uso da tecnologia de microondas para preparação de amostras, foi proposto já há alguns anos, principalmente por contribuir significativamente na redução do tempo de extração e na quantidade de solvente utilizado. Há registros na literatura de usos destes métodos com boas percentagens de recuperação para a extração de pesticidas em amostras de solo (PEDRÓN et al., 2005) e de alimentos (BARRIADA et al., 2007).

A extração assistida por microondas (*Microwave Assisted Extraction* - MAE) é uma técnica, na qual as radiações eletromagnéticas interagem diretamente com a matéria, provocando aquecimento devido à interação do campo elétrico das moléculas com as ondas eletromagnéticas em diferentes fases, provocando condução iônica e rotação dipolar. Na condução iônica, o campo magnético faz com que os íons dissolvidos na solução migrem. Enquanto que, na rotação dipolar há interação do campo elétrico da molécula com o campo elétrico das microondas, provocando o aquecimento devido à intensa agitação das moléculas (OLIVEIRA, SARTINI, ZAGATTO, 2000).

Os químicos tinham muita dificuldade para estudar os carboidratos. Não se conheciam técnicas de separação e quantificação, a não ser a recristalização. Estas, por sua vez, eram muito trabalhosas e demoradas. Com o passar do tempo foram sendo desenvolvidas técnicas melhores de análise utilizando, por exemplo, a refratometria, a espectrofotometria, a amperometria e a cromatografia (ALLINGER et al., 1976).

A estimativa de açúcares não redutores, ainda é habitualmente feita pela diferença entre os açúcares redutores, seguindo a metodologia de Nelson (1944) e Somogy (1952), e os açúcares solúveis totais, determinados pela reação com antrona (HODGE, HODFREITER, 1962) ou Fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Porém, nenhuma delas se aplica a açúcares solúveis e livres, e também não permite a discriminação dos carboidratos individualmente.

Na literatura são descritas várias técnicas para a identificação e quantificação de carboidratos em diferentes matrizes, utilizando: eletroquímica com

eletrodos bioenzimáticos (MAESTRE et al., 2005); análise por injeção em fluxo com detector amperométrico e reator enzimático (MATOS et al., 2005); eletroforese capilar com detector ultravioleta (JAGER, TONIN, TAVARES, 2007); cromatografia a gás com detector de ionização de chama após derivatização da amostra (GOMEZ et al., 1999) e cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (MANDEBVU et al., 1999). Utilizando cromatografia líquida de alta eficiência foram encontrados trabalhos com detecção por: índice de refração (HPLC-RID) (BRITO, RODELLA, DESCHAMPS, 2003; CASLER, HATFIELD, 2006); arranjo de diodo (HPLC-DAD) (TUBEROSO et al., 2007), UV-Vis com reação pós-coluna (PAULI, CRISTIANO, NIXDORF, 2011), pulso amperométrico (COUTINHO, 2003; GARCIA et al., 2009; DIONEX, 2012) e espectrometria de massas (LC-MS/MS) (SHEWMAKER et al., 2006).

Dentre as técnicas aplicadas para a quantificação dos carboidratos, a cromatografia líquida de alta eficiência vem ganhando espaço por possibilitar a separação de misturas complexas com alto grau de resolução. Em análises de café, esta é uma técnica imprescindível para a determinação de compostos como: cafeína, ácidos clorogênicos, trigonelina, carboidratos, entre outros, presentes na bebida (CASAL, OLIVEIRA, FERREIRA, 1998).

A cromatografia é uma técnica de separação que permite determinar a composição de misturas complexas de diversas substâncias químicas, com grande eficiência e reprodutibilidade. É um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1990).

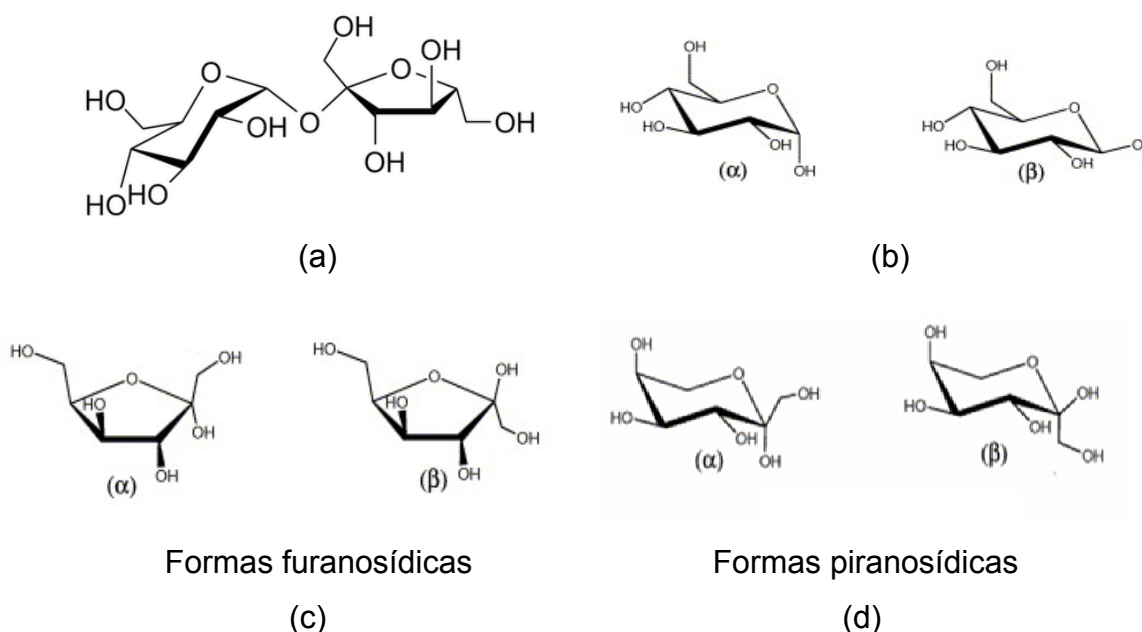
A determinação de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE do inglês HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a detecção por Índice de Refração (RID – do inglês *Refractive Index Detector*), já vem sendo utilizada desde o princípio da década de 70. Praticamente, todos os carboidratos, por conterem um centro estereogênico, podem ser quantificados utilizando detectores por índice de refração (BLATT, 1987).

A detecção por índice de refração é amplamente utilizado em HPLC, especialmente para carboidratos. Este detector monitora continuamente a diferença de índice de refração entre a fase móvel pura e o eluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra. Para solutos que não absorvem no UV ou visível e, conseqüentemente, não são detectados por detectores fotométricos, a melhor escolha é o detector por índice de refração. A resposta deste detector é universal e sua sensibilidade é moderada, geralmente da ordem de micrograma ( $10^{-6}$  g). Este nível de concentração corresponde a uma diferença no índice de refração entre a amostra e a fase móvel de aproximadamente  $10^{-7}$  unidades de índice de refração. Para observar esta diferença é necessário um controle de temperatura de aproximadamente  $0,001^{\circ}\text{C}$ , o que normalmente é conseguido por circulação de água, de uma boa fonte termostatizada, através do refratômetro ou um bom controle da temperatura ambiente. Este detector ainda sofre interferência aos componentes da matriz da amostra e, apresenta sensibilidade às variações de vazão e mudanças na composição da fase móvel, que impedem o uso de gradiente, por ser difícil encontrar um par de solventes com índices de refração idênticos. Qualquer mudança na composição da mistura mudará o índice de refração da fase móvel (CIOLA, 1988; SKOOG, LEARY, 1992; SNYDER, KIRKLAND, 1979)

As fases estacionárias das colunas, utilizadas na separação dos carboidratos por esse método, são freqüentemente constituídas de um suporte de sílica com ligantes amino ou polímeros de troca catiônica recobertos com grupamentos metálicos. Quando se faz uso de colunas com polímeros de troca catiônica recobertos com grupamentos metálicos, há a necessidade de aquecimento da coluna, para que se tenha uma boa resolução entre os picos. Estas fases possuem algumas limitações quanto à fase móvel, além de requerer atenção quanto à solubilidade e concentração da amostra. Isto, usualmente impede o uso de gradientes, além de necessitar de uma rigorosa limpeza (*clean-up*) da amostra antes da injeção (DIONEX, 2012).

Segundo Inoue (2011) há diferenças estruturais entre a sacarose, glicose e frutose (Fig. 2), com conformações termodinamicamente mais estáveis no equilíbrio distintas para os carboidratos (Tab. 2), bem como, apresentam diferenças de ionização em meio aquoso (Tab. 2 e 3), o que interfere diretamente na ordem de eluição dos compostos, que são dependentes das interações, de acordo com o tipo de coluna cromatográfica empregada.

**Figura 2** – Estruturas químicas da (a) sacarose; (b)  $\alpha$  e  $\beta$  D-glicose; (c) D-frutose, nas formas  $\alpha$  e  $\beta$  furanosídicas; (d) D-frutose, nas formas  $\alpha$  e  $\beta$  piranosídicas



**Tabela 2** – Composição de aldoses, em solução aquosa, no equilíbrio

Aldose	$pK_a$ [21] (25 °C)	temperature (°C)	pyranose		furanose	
			$\alpha$ (%)	$\beta$ (%)	$\alpha$ (%)	$\beta$ (%)
arabinose	12.34	31	60	35.5	2.5	2
xylose	12.15	31	36.5	63	<1	<1
glucose	12.28	31	38	62	• •	0.14
mannose	12.08	44	64.9	34.2	0.6	0.3
galactose	12.35	31	30	64	2.5	3.5

Fonte: Inoue et al. (2011).

**Tabela 3** – Valores de  $pK_a$  dos açúcares estudados em solução aquosa

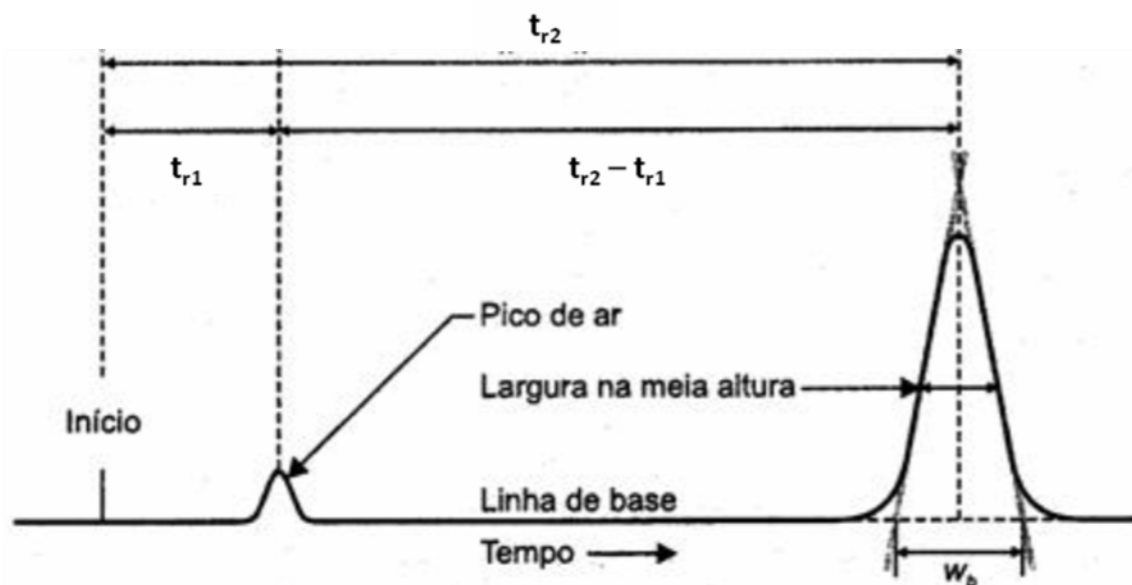
Açúcares	$pK_a$ a 25 °C
<b>Sacarose</b>	12,62
<b>Glicose</b>	12,28
<b>Frutose</b>	12,03

Fonte: Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products (2012).

Os parâmetros cromatográficos são uma ferramenta importante para avaliar e caracterizar cromatograficamente uma coluna de HPLC. Adicionalmente, antes de realizar a validação da metodologia, é fundamental averiguar se as

condições estabelecidas na análise cromatográfica são capazes de gerar dados confiáveis. Assim, é importante verificar se os parâmetros cromatográficos estão de acordo com os limites recomendados e aceitos. Entre eles estão: Fator de separação ( $\alpha$ ), que expressa a separação entre dois analitos, e é calculado pela relação existente entre o fator de retenção, sendo o parâmetro que possui maior influência na resolução cromatográfica; Resolução ( $R_s$ ), que é a medida da separação entre dois compostos, obtida através da distância entre os dois picos cromatográficos e suas respectivas larguras de base; e Assimetria ( $A_s$ ), onde se observa as distorções frontais e caudas nos picos cromatográficos, que podem ser avaliados através deste fator, calculado a 10% da altura do pico, de acordo com a Figura 3 (LANÇAS, 2004).

**Figura 3** – Cromatograma ilustrativo dos parâmetros cromatográficos



Fonte: Adaptado de Lanças (2004).

É importante que se faça a diferenciação entre carboidratos livres ou também denominados de açúcares solúveis, dos carboidratos totais. A análise de carboidratos livres trata do conteúdo individual de cada monossacarídeo (arabinose, galactose, glicose, manose, frutose) e dos conteúdos de sacarose e manitol extraídos de uma amostra de café solúvel, sem que haja hidrólise dos carboidratos. Por sua vez, a análise de carboidratos totais trata do conteúdo individual de cada monossacarídeo (arabinose, galactose, glicose, xilose, manose)

e o conteúdo de manitol extraídos de uma amostra de café solúvel, no qual os carboidratos passaram por uma etapa de hidrólise (COUTINHO, 2003).

No grupo de pesquisa do Laboratório DIA-UEL, o café vem sendo alvo de estudos há alguns anos. O grupo tem atuado no desenvolvimento e validação de metodologias, utilizando a técnica de HPLC, acoplada a detecção eletroquímica aplicada ao café torrado e moído (GARCIA et al., 2009) e UV-Vis com pós-coluna para café solúvel (PAULI, CRISTIANO, NIXDORF, 2011), através da determinação dos carboidratos totais, especialmente voltadas a demanda que identifique a má qualidade e as fraudes. Porém, observou-se a escassez na literatura de métodos para determinação dos carboidratos livres, importantes para caracterização varietal e genética do café verde, apontados em estudos recentes como os de Kitzberger (2012). A busca visa tentar auxiliar na verificação da relação entre a composição química do grão e a qualidade do café, a partir do monitoramento de açúcares solúveis, com o fim de estabelecer mais parâmetros capazes de definir a qualidade do produto final.

Pelo fato da matriz de café verde apresentar concentrações de sacarose, glicose e frutose em quantidades quantificáveis, segundo relatos de Rogers et al. (1999), comprovadas por experimentos preliminares, realizados no HPLC-RID disponível no Laboratório de Multiusuários da UEL - LAPA, optou-se pelo desenvolvimento de uma metodologia com este sistema. A simplicidade de operação e estabilidade, considerando o tempo de corrida relativamente curto (20 min), com ausência de restrições quanto à natureza do analito (por se tratar de um detector universal), juntamente com a possibilidade do uso de solvente universal atóxico como a água, foram fatores adicionais motivadores para o estudo.

Visando encontrar as condições analíticas mais adequadas, com o menor número de experimentos, lançou-se mão do planejamento fatorial que é executado com o interesse em determinar as variáveis experimentais, e as interações entre elas, que têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse. Após selecionar as variáveis que são possíveis de serem estudadas, e que provavelmente interferem no sistema, é preciso avaliar a metodologia experimental (tempo, custo, etc.). As variáveis que não foram selecionadas devem ser fixadas durante todo o experimento, segundo Teófilo e Ferreira (2006).

Se a combinação de  $k$  fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de  $2k$  experimentos. Normalmente, os níveis dos

fatores quantitativos (concentrações de uma substância, valores de pH, etc.) devem ser nomeados pelos sinais (-) (negativo) para o nível mais baixo e (+) (positivo) para o nível mais alto. Porém, o que importa é a relação inicial entre o sinal dado e o efeito obtido, não havendo um critério definido na nomeação dos sinais. Para fatores qualitativos (tipos de ácidos, tipos de catalisadores, etc.), como a existência de valores altos ou baixos é relativo, fica a critério do pesquisador nomear os seus níveis. Os sinais para os efeitos de interação de 2ª ordem e de ordem superior entre todas as variáveis do planejamento, realizando todas as combinações possíveis, são obtidos pelo produto dos sinais originais das variáveis envolvidas. Desta maneira, é possível construir as colunas de sinais para todas as interações (TEÓFILO, FERREIRA, 2006).

Pode-se fazer uso de um gráfico de probabilidade acumulada, também conhecida como análise por meio de gráficos normais, o qual permite entender melhor o comportamento dos efeitos deste planejamento, de acordo com Barros, Scarminio e Bruns (2001).

Devido à grande escassez de estudos envolvendo a extração de açúcares em café verde, este trabalho vem propor o uso da utilização da água como solvente extrator e fase móvel. E para atender as necessidades da quantificação desses açúcares, foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência empregando detecção por índice de refração (HPLC-RID).

Visando subsidiar pesquisas futuras que envolvam a qualidade do café verde, a partir dos estudos feitos por Chagas (1994) e Vilas Boas et al. (2001), este trabalho resolveu explorar a influência de variáveis nas condições analíticas: tempo de extração, temperatura, quantidade amostral, e 2 técnicas distintas, verificando o desempenho da técnica alternativa utilizando o microondas frente à agitação orbital, na extração dos carboidratos livres do café verde. Para isto, a extração dos açúcares presente no café verde, pelo método da técnica de microondas, contou com a programação de tempo, temperatura e pressão no interior dos tubos, enquanto a da agitação orbital, foi feita a partir de uma incubadora de bancada, com controle de temperatura e velocidade de agitação.

Os resultados foram avaliados através de protocolos de validação de metodologias, atestadas por órgãos de padronização.

O processo de validação tem por objetivo garantir que os dados gerados no método desenvolvido são confiáveis e se podem ser aplicados em análise de rotina (NAZARIO, 2013).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através do Documento - RE nº 899/2003 e RDC nº 27/2012, efetua recomendações para validação em métodos bioanalíticos. Além disso, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) fornece guias de validação analítico através do documento DOQ-CGCRE-008.

A validação do método foi feita considerando os parâmetros de seletividade, repetitividade, linearidade e faixa dinâmica de trabalho, limite de detecção e de quantificação, precisão intermediária, exatidão e taxa de recuperação do método, baseados no Guia do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (R2) de 2007 e (R4) de 2011, ICH Q2(R1) de 2005, e ANVISA (BRASIL, 2003b).

São preconizados os mesmos parâmetros de validação pelos Guias ICH Q2 (R1), Resolução - RE nº 899/2003 e FDA, a saber: especificidade / seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez.

A terminologia de alguns parâmetros difere no Guia do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (R4) de 2011, mas a definição é semelhante àquelas dos demais guias.

A curva analítica pode ser obtida através da padronização externa, padronização interna ou padronização por adição de padrão (NAZARIO, 2013).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Os guias de validação recomendam utilizar de cinco a seis concentrações diferentes para avaliar a linearidade do método (INMETRO, 2011; ICH, 2005; ANVISA, 2003).

A faixa de trabalho compreende os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente, é derivado do estudo de linearidade e é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados (INMETRO, 2011).

A seletividade do método é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Conceitualmente, um

método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2007; IUPAC, 2001).

A sensibilidade do método avalia a capacidade de discriminar concentrações próximas de um analito. Esse termo não deve ser confundido com detectabilidade no qual avalia os limites de detecção e quantificação. O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito detectado na amostra que pode ser diferenciada do ruído da linha de base. O LD pode ser estabelecido como sendo três vezes o valor do ruído da linha de base. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade que pode ser determinada na amostra com precisão e exatidão adequada e pode ser estabelecida como sendo dez vezes o valor do ruído da linha de base (ICH Q2 (R1), Resolução - RE nº 899/2003, INMETRO, 2011).

A precisão (denominada repetitividade segundo o INMETRO ou repetibilidade pela Anvisa) é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode ser expressa em desvio padrão relativo (DPR) (Resolução - RE nº 899/2003).

A precisão intermediária, também conhecida como precisão intracorrída, analisa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista, amostra e instrumentação (INMETRO, 2007).

A reprodutibilidade avalia a concordância dos resultados utilizando o mesmo método, mesma amostra com diferentes equipamentos, analistas e laboratórios. O desvio padrão dos ensaios de reprodutibilidade é cerca de duas vezes maior que os ensaios de repetitividade. Quando não há possibilidade de realizar os ensaios em condições de reprodutibilidade interlaboratorial pode-se avaliar a reprodutibilidade intralaboratorial no qual os experimentos são conduzidos no mesmo laboratório, equipamento e amostra, e variando analista e temperatura da sala por exemplo (INMETRO, 2007).

A taxa recuperação avalia a eficiência de extração do método analítico. Expresso através da percentagem do analito extraído de um branco fortificado em relação à uma amostra, que não foi submetida ao processo de extração (INMETRO, 2007; 2011).

Testes estatísticos foram utilizados para a avaliar a extração, comparando-se as médias encontradas para as 2 técnicas distintas, a partir do somatório das concentrações dos açúcares, determinados individualmente.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver e validar um método para análise de açúcares livres (sacarose, glicose e frutose) em café verde, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração (HPLC-RID), comparando o uso de microondas e agitação orbital, na etapa de extração.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 AMOSTRA

As amostras de café verde foram cedidas pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR).

Buscando representatividade amostral e visando a obtenção do perfil de carboidratos livres mais próximo do real, foi feita uma mistura das principais cultivares da região do norte Pioneiro, dentre elas: Iapar 59, Obatã, Catuaí, Mundo Novo e Icatu, da safra de 2010. Estes grãos foram classificados como contendo menos de 80 defeitos, conforme a Instrução Normativa nº 8 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de Junho de 2003 (BRASIL, 2003 a). Defeitos são caracterizados por serem grãos imaturos, brocados, ardidos e quebrados, separados por máquinas eletrônicas e um conjunto de peneiras.

Na moagem da mistura de grãos, utilizou-se nitrogênio líquido para evitar a degradação térmica dos compostos presentes na matriz, seguido de passagem em peneira 0,71 mm para padronização da granulometria. As amostras foram mantidas em refrigerador à 4°C, para a sua melhor conservação.

#### 3.2 REAGENTES

Os padrões empregados foram: sacarose (Synth, Brasil); D(+) – glicose e D(-) – frutose (Merck, Darmstadt, Alemanha) com teores de pureza de 98,90%; 99,50% e 99,90% respectivamente. Devido à grande higroscopicidade dos carboidratos, os padrões foram mantidos em dessecador de vidro, com vácuo e pentóxido de fósforo (Merck, Darmstadt, Alemanha) e foram utilizados somente depois de uma semana de dessecamento.

A água ultrapura utilizada no preparo das soluções e extração foi produzida pelo sistema Milli-Q® (Simplicity 185, Millipore, MA, EUA) do Laboratório DIA - UEL.

### 3.3 EQUIPAMENTOS

Para extração dos carboidratos solúveis do café verde foi utilizado um sistema de reação por microondas - Modelo 3000/Synthos 3000, rotor 16MF100, com 16 vasos de PEEK, com volume total de 100 mL. Velocidade de 3 rpm, dimensões: 60 x 72 x 74 cm, Potência: 1700 W (Anton Paar GmbH<sup>®</sup>, Graz, Austria), instalado no Laboratório Multiusuário LAPA, e uma incubadora de bancada com agitação orbital (modelo CT-712, CIENTEC<sup>®</sup>, Piracicaba, Brasil) com capacidade para 20 frascos, pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

Na centrifugação, empregou-se uma centrífuga - Velocidade máxima de até 3500 rpm, 1 rotor CP-16 para 16 tubos de 15 mL e adaptadores para tubos de 8 mL (Labstore<sup>®</sup>, Curitiba, Brasil) pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica (LEEAA/LAPA).

A separação e quantificação dos carboidratos foram feitas em sistema cromatográfico líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kioto, Japão), empregando uma coluna de troca catiônica recheada com divinilbenzeno, com 8% de ligação cruzada, com íons de Pb (II) - Aminex HPX-87P (300 mm x 7,8 mm, 9 µm, Biorad, EUA). É necessário atentar para as restrições da coluna: quanto a faixa permitida de uso de pH de 5 a 9, e da impossibilidade do emprego de qualquer solvente orgânico. O injetor manual Rheodyne 7125 continha alça de amostragem de 20,0 µL. A detecção foi feita em detector por índice de refração RID-10A (Shimadzu). A integração dos picos foi feita utilizando *software Class-VP*.

### 3.4 PLANEJAMENTO FATORIAL

Objetivando maximizar a extração dos açúcares livres - sacarose, glicose e frutose, de baixo peso molecular predominantes em café verde, empregou-se a extração - assistida por microondas e por agitação orbital.

Visando otimizar as condições analíticas com um número reduzido de experimentos, o estudo aplicou um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, com triplicata do ponto central (PC), para cada técnica de extração, conforme apresentado nas Tabelas 4 e 5. A influência das 4 variáveis na extração: técnica extrativa, tempo de extração, temperatura e a quantidade de amostra, foi avaliada.

Pelo fato de, na literatura, não terem sido encontrados muitos métodos descritos para determinação de açúcares livres, em café verde, empregando cromatografia líquida, houve a necessidade de fazer testes exploratórios para fixar os níveis e variáveis selecionados para o planejamento fatorial foram realizados, conforme mostra as Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4** - Fatores e seus respectivos níveis para extração empregando microondas e agitação orbital (200 rpm)

Fatores	Variáveis	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
1	Técnica de extração: microondas ou agitação orbital	Controle ou Testemunha Sem aplicação das técnicas	Com aplicação das técnicas	Com aplicação das técnicas
2	Tempo (minutos)	30	60	90
3	Temperatura (°C)	30	45	60
4	Quantidade de amostra (mg)	300,0	400,0	500,0

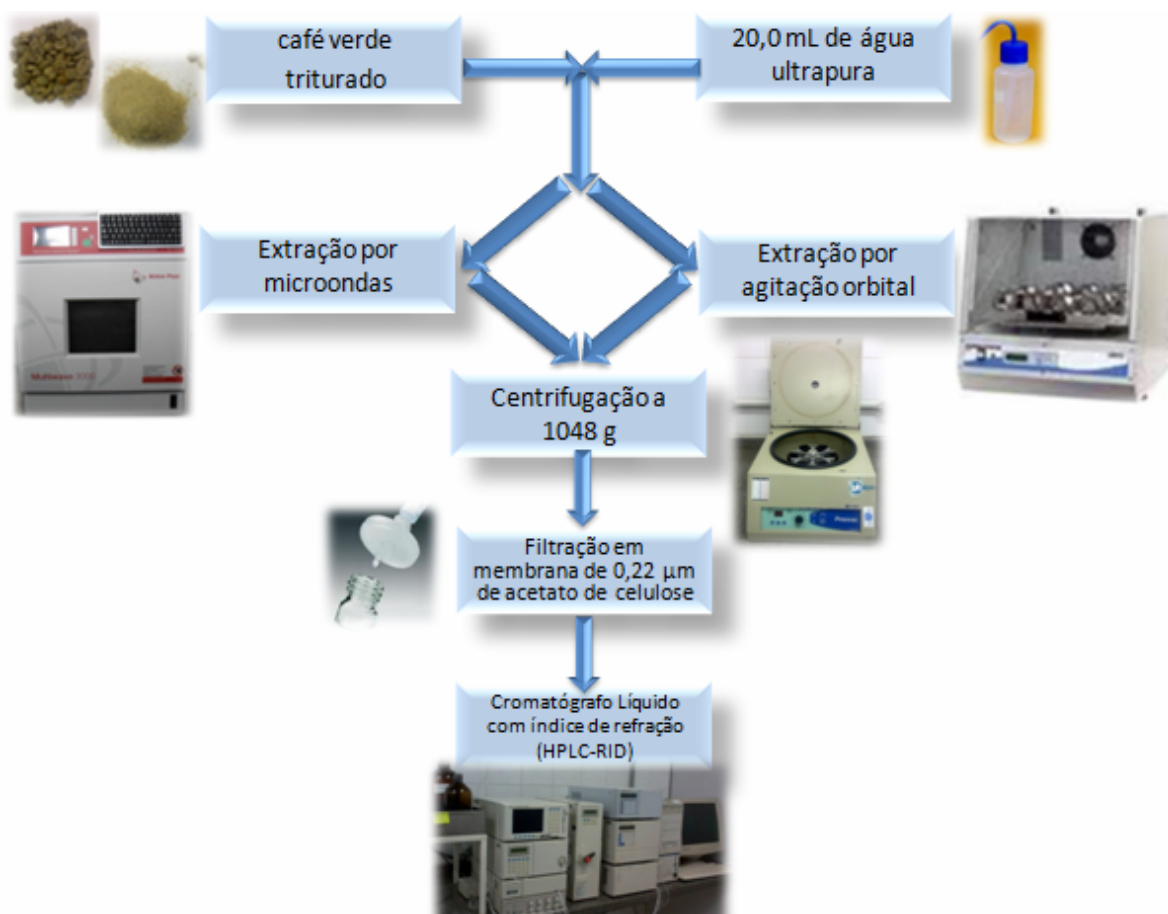
**Tabela 5** - Planejamento fatorial ( $2^4 + 3$ ) para os experimentos de extração empregando microondas e agitação orbital em 2 níveis, variando: as técnicas extrativas (Fator 1); o tempo de extração (Fator 2); a temperatura (Fator 3) e a massa de amostra (Fator 4)

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4
1	- 1	- 1	- 1	- 1
2	+1	- 1	- 1	- 1
3	- 1	+1	- 1	- 1
4	+1	+1	- 1	- 1
5	- 1	- 1	+1	- 1
6	+1	- 1	+1	- 1
7	- 1	+1	+1	- 1
8	+1	+1	+1	- 1
9	- 1	- 1	- 1	+1
10	+1	- 1	- 1	+1
11	- 1	+1	- 1	+1
12	+1	+1	- 1	+1
13	- 1	- 1	+1	+1
14	+1	- 1	+1	+1
15	- 1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17 (PC)	0	0	0	0
18 (PC)	0	0	0	0
19 (PC)	0	0	0	0

PC: ponto central

Um esquema dos procedimentos, para a extração dos carboidratos solúveis, está apresentado na Figura 4.

**Figura 4** - Etapas do processo de extração aquosa de carboidratos em café verde por microondas e agitador orbital



### 3.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA EM HPLC-IR

A metodologia foi validada através da avaliação da seletividade, repetitividade, linearidade, faixa dinâmica de trabalho, limite de detecção e de quantificação, precisão intermediária e taxa de recuperação.

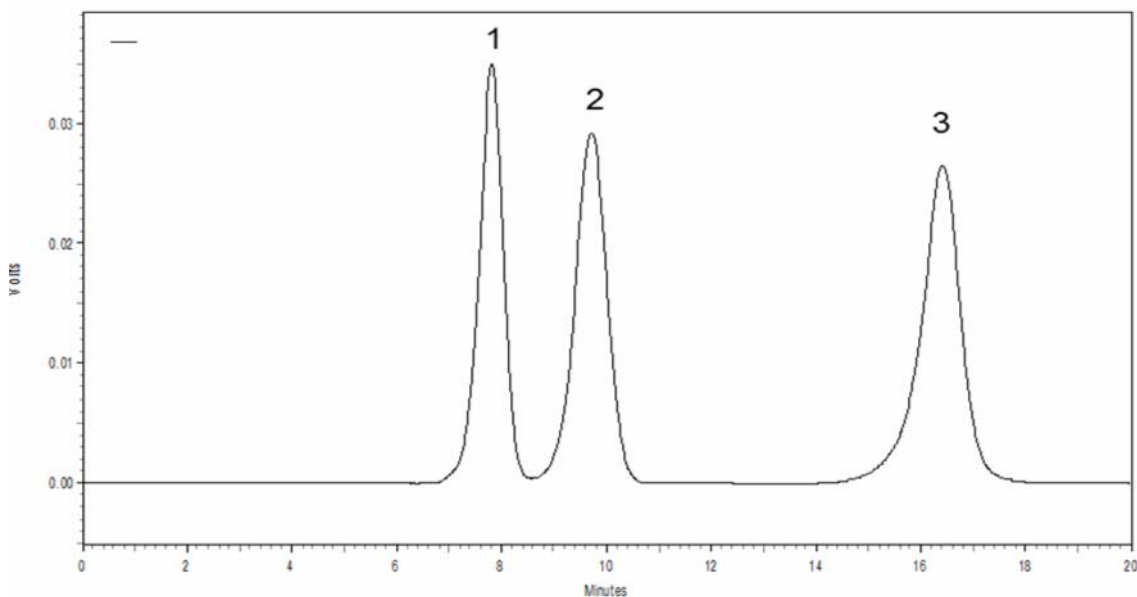
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

#### 4.1.1 Cromatograma dos Açúcares Livres e Parâmetros Cromatográficos

A Figura 5 apresenta um cromatograma obtido para o padrão da mistura de sacarose, glicose e frutose, na concentração de  $10,0 \text{ g L}^{-1}$  empregando o sistema cromatográfico Shimadzu com detecção de índice de refração. A fase móvel empregada foi água ultrapura, com vazão de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ , com a injeção de  $20,0 \mu\text{L}$  de amostra, em coluna Aminex HPX-87P mantida à  $80^\circ\text{C}$ .

**Figura 5** – Cromatograma do padrão da mistura dos açúcares, na concentração de  $10,0 \text{ g L}^{-1}$ . Picos: (1) sacarose, (2) glicose e (3) frutose, com tempos de retenção em 7,8; 9,7 e 16,4 minutos, respectivamente



Os parâmetros cromatográficos foram obtidos do cromatograma da Figura 5, conforme esquema apresentado na Figura 3. Os Fatores de separação foram calculado pela Equação 1. A Resolução entre os picos calculada pela Equação 2 e a Assimetria dos picos pela Equação 3, baseados em Lanças (2004), cujos resultados estão apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6** – Parâmetros cromatográficos para avaliação do desempenho da coluna na separação de picos

Parâmetro cromatográfico	Valores obtidos para os picos (1) sacarose; (2) glicose; (3) frutose	Valor adequado
<p>Fator de separação (<math>\alpha</math>)</p> $\alpha = \frac{t_{r2}}{t_{r1}} \quad (\text{Eq.1})$	$\alpha_{1,2} = 1,2$ $\alpha_{1,3} = 1,9$ $\alpha_{2,3} = 1,6$	
<p>Resolução de Pico (<math>R_s</math>)</p> $R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (\text{Eq.2})$	$R_{s1,2} = 1,1$ $R_{s1,3} = 2,4$ $R_{s2,3} = 1,9$	$R_s > 1,0$
<p>Assimetria de Pico (<math>A_s</math>)</p> $A_s = \frac{b}{a} \quad (\text{Eq.3})$	$A_{s1} = 0,9$ $A_{s2} = 1,3$ $A_{s3} = 1,2$	$A_s \leq 2$

$t_{r1}$  e  $t_{r2}$ : tempo de retenção dos picos 1 e 2;  
 $w_{b1}$  e  $w_{b2}$ : largura da base dos picos 1 e 2;  
 $a$  e  $b$ : distância do eixo central do pico – positiva e negativa

Observando-se os resultados da Tabela 6, é possível perceber que houve boa separação, resolução e simetria para os picos dos 3 açúcares avaliados, aplicando-se o método desenvolvido.

A ordem de eluição dos açúcares foi justificada pela conformação mais estável das estruturas em meio aquoso e pelos valores de  $pK_a$  (Fig. 2 e Tab. 2 e 3), concordando com as observações feitas por Inoue et al. (2011).

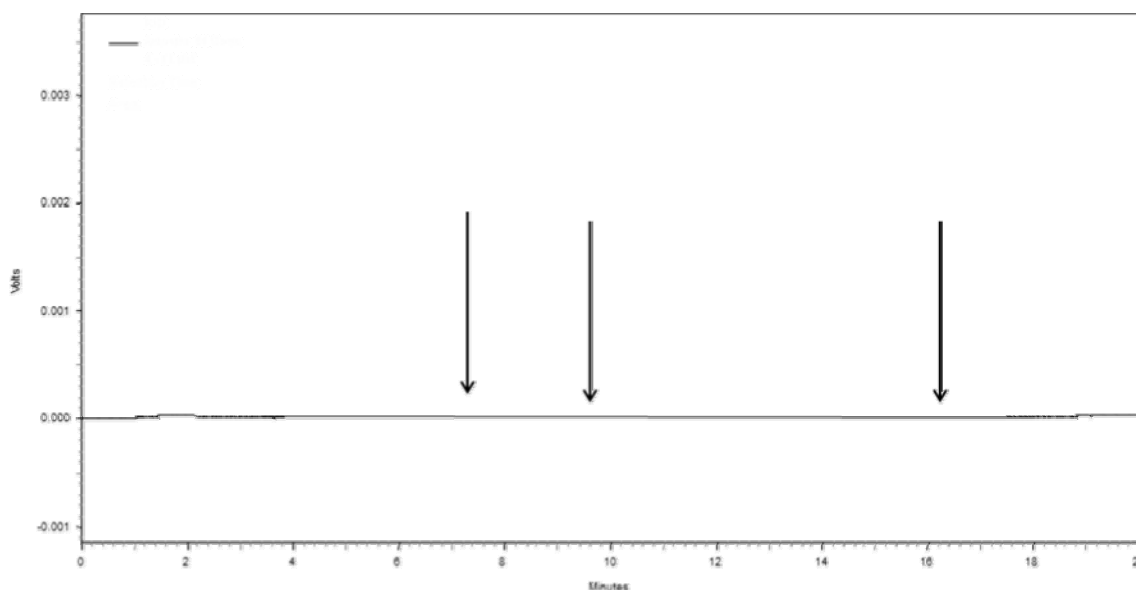
A frutose foi o composto mais retido na coluna, sendo explicado pela cinética e termodinâmica do seu equilíbrio em meio aquoso. O hidrogênio ácido adjacente à função redutora da frutose (uma cetose), cineticamente mais lábil, é mais facilmente desprotonado. Desta forma, este foi o primeiro composto a ficar carregado, e conseqüentemente o primeiro a interagir com o metal carregado, passando mais tempo na coluna de troca iônica, comparado a glicose (uma aldose), por exemplo. Em termos termodinâmicos, a conformação estrutural mais estável, e frequente, da frutose, em meio aquoso, é a do tipo furanose, que possui menor impedimento estérico, propiciando assim, uma maior interação com o metal da resina catiônica da fase estacionária, conduzindo também a maior retenção.

Quanto ao  $pK_a$ , a eluição se deu em ordem decrescente dos valores, eluindo primeiramente a que tem maior  $pK_a$ , a sacarose com 12,62 e por último a frutose que apresenta o menor valor de 12,03.

#### 4.1.2 Seletividade do Método

A seletividade foi comprovada através do tempo de retenção dos açúcares idênticos no padrão externo e nas amostras, bem como pelo aumento de área dos picos, quando efetuada a fortificação. Não houve interferência, comprovada pela ausência de resposta analítica nos tempos de retenção da sacarose, glicose e frutose, quando injetado água ultrapura, como pode ser visto na Figura 6, conforme procedimento descrito pelo INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH (2005).

**Figura 6** – Cromatograma da injeção da água ultrapura mostrando ausência de picos interferentes nos tempos de retenção da sacarose (7,8 min.); glicose (9,7 min.) e frutose (16,4 min.)



#### 4.1.3 Precisão (Repetitividade)

A precisão foi determinada pela repetitividade de sete injeções sucessivas de padrão analítico  $10,0 \text{ g L}^{-1}$ , com desvios padrão relativos (DPR) determinados para as áreas, que foram inferiores a 5%, conforme Tabela 7.

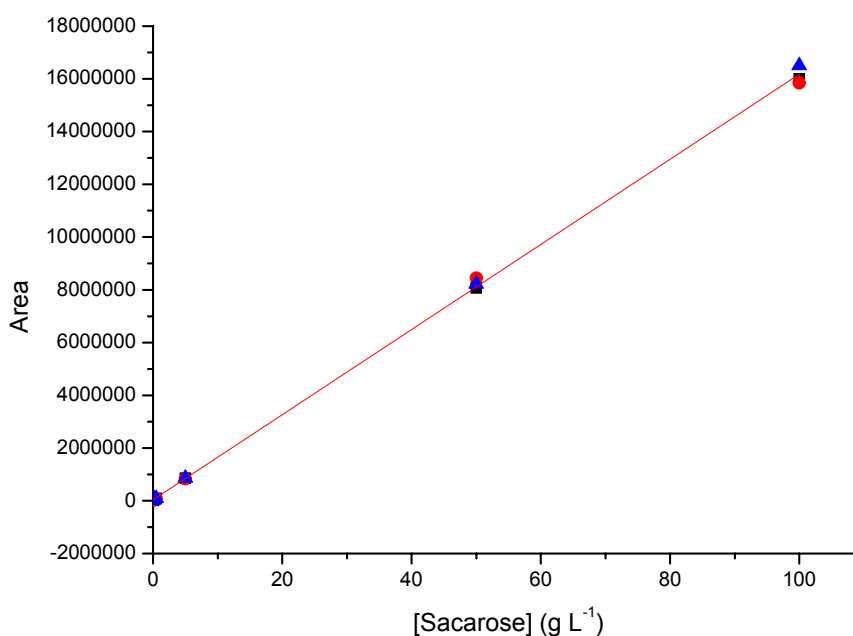
**Tabela 7** – Precisão calculada pela repetitividade da mistura do padrão analítico na concentração de 10,0 g L<sup>-1</sup>, injetadas sob mesmas condições de preparo (n = 7)

Precisão	Sacarose	Glicose	Frutose
Áreas médias	2101096	2036450	2018913
Desvio Padrão	9546	30139	17251
Desvio Padrão Relativo (%)	0,45	1,48	0,85

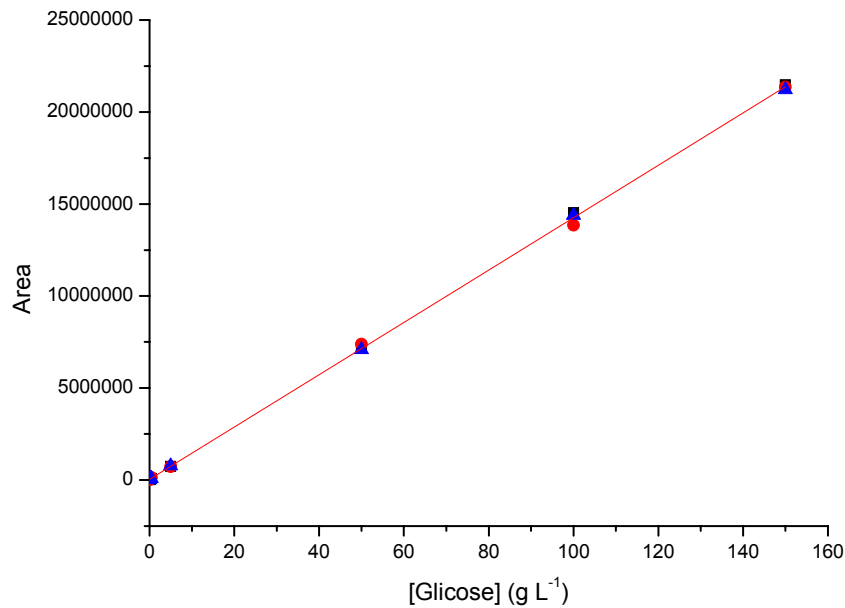
#### 4.1.4 Linearidade e Faixa Dinâmica de Trabalho

As Figuras 7, 8 e 9 mostram as três curvas analíticas feitas em dias distintos a partir da média da triplicata das concentrações de 0,0625; 5,0; 50,0 e 100,0 g L<sup>-1</sup> para sacarose (este açúcar alcança a capacidade máxima de quantificação primeiro que os outros dois) e, de 0,0625; 5,0; 50,0; 100,0 e 150,0 g L<sup>-1</sup>, para glicose e frutose. Estas curvas foram utilizadas para verificação da linearidade, faixa dinâmica de trabalho e dos limites de detecção e quantificação.

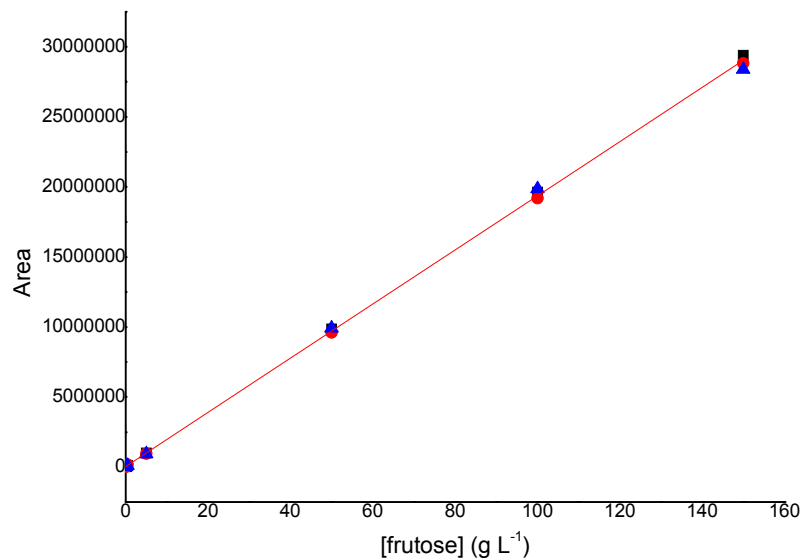
**Figura 7** – Curva analítica para sacarose levantada com dados médios de triplicatas obtidos em 3 diferentes dias sob as mesmas condições de preparo



**Figura 8** – Curva analítica para glicose levantada com dados médios de triplicatas obtidos em 3 diferentes dias sob as mesmas condições de preparo



**Figura 9** – Curva analítica para sacarose levantada com dados médios de triplicatas obtidos em 3 diferentes dias sob as mesmas condições de preparo



A Tabela 8 apresenta as Equações das retas com seus respectivos coeficientes de correlação linear e as faixas dinâmicas de trabalho para os carboidratos livres analisados.

**Tabela 8** - Equações das retas com coeficientes de correlação linear nas faixas dinâmicas de trabalho dos três açúcares estudados

Carboidratos livres	Modelo ajustado	Coefficiente de correlação (r) (p<0,01)	Faixa dinâmica de trabalho (g L <sup>-1</sup> )
<b>Sacarose</b>	$y = 1,6004 \cdot 10^6 x + 18833,6$	0,99938	0,0625 – 100,0
<b>Glicose</b>	$y = 1,4363 \cdot 10^6 x + 17195,1$	0,99971	0,0625 – 150,0
<b>Frutose</b>	$y = 1,9604 \cdot 10^6 x + 17195,1$	0,99955	0,0625 – 150,0

A linearidade pôde ser verificada pelos coeficientes de correlação superiores a 0,999 para sacarose, glicose e frutose na faixa dinâmica de trabalho. O equipamento foi mais sensível para a quantificação da frutose, expresso pela maior inclinação da reta de regressão, de acordo com o INMETRO (2007), embora as respostas tenham sido similares para os três.

#### 4.1.5 Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Foi injetado um padrão diluído da mistura padrão dos 3 açúcares, e observou-se a quantidade mínima detectável pelo equipamento na prática foi de 0,0625 g L<sup>-1</sup> para o limite de quantificação (LQ), e de 0,020 g L<sup>-1</sup> para o limite de detecção (LD). Estes resultados concordaram com as relações calculadas pelo método de 3 e 10 vezes a razão sinal/ruído, para o LD e LQ, respectivamente (ICH, 2005).

#### 4.1.6 Precisão Intermediária

A precisão intermediária do método foi de 0,67% para sacarose, 1,09% para a glicose e 2,60% para a frutose, calculada a partir dos desvios padrão relativos de uma amostra extraída e analisada em 3 dias diferentes, por 3 analistas distintos, gerando triplicatas em cada dia e por cada analista. O método mostrou-se excelente para a precisão intermediária, considerando que os coeficientes de variação foram inferiores a 15%, valor adotado como referência de acordo com a Resolução da ANVISA RE - nº 899 de 29 de maio de 2003.

#### 4.1.7 Taxa de Recuperação

O método demonstrou-se exato para ambas as técnicas de extração estudadas, uma vez que as taxas de recuperação calculados pela Equação 4 para a adição de padrão em diferentes concentrações nos diferentes experimentos, variaram de 89,45 a 104,16% (Tabela 9), estando dentro do intervalo de 70 a 120% aceito pela ANVISA (2003), com desvios padrão médios de 2,87 a 4,89%.

$$\text{Taxa de Recuperação (\%)} = (C_1 - C_2) \times \frac{100}{C_3} \quad (\text{Eq.4})$$

Onde:

$C_1$ : concentração determinada na amostra com adição de padrão;

$C_2$ : concentração determinada na amostra sem adição de padrão;

$C_3$ : concentração do padrão adicionado.

Para a extração por microondas observou-se taxas de recuperação médias de: 97,33% para a sacarose (variando de 94,20 a 99,25%); 97,34% para a glicose (variando de 92,10 – 100,50%); e 99,19% para a frutose (variando de 89,45 - 102,01%). Enquanto que, para a extração por agitação orbital, as taxas de recuperação médias foram de 97,97% para sacarose (variando de 93,78 a 103,66%); de 95,81% para glicose (variando de 91,12 a 100,56%); e de 97,76% de frutose (variando de 90,12 - 104,16%). Portanto, conclui-se que ambas as técnicas foram confiáveis.

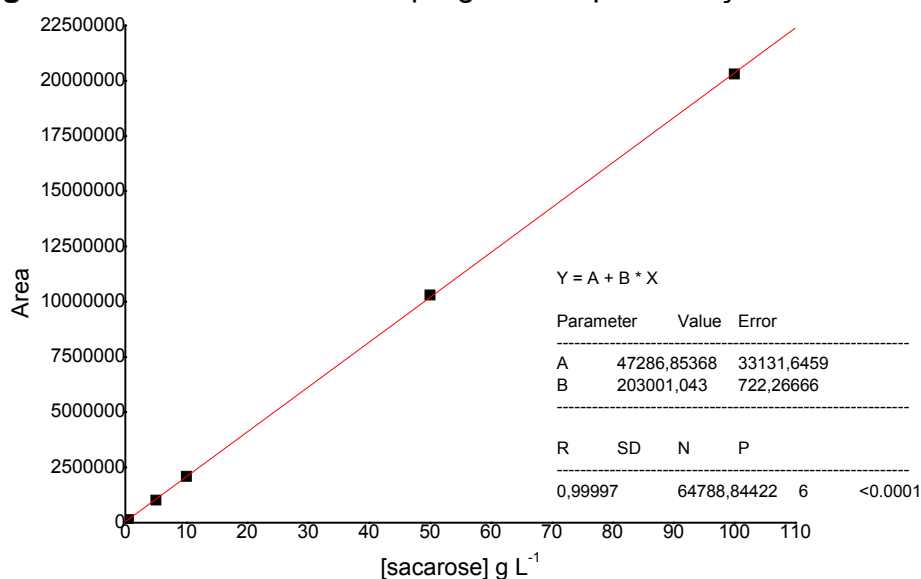
**Tabela 9** - Taxa de Recuperação dos ensaios submetidos às técnicas de extração por microondas e agitação orbital, conforme o planejamento fatorial  $2^4$ , com triplicata no ponto central (PC)

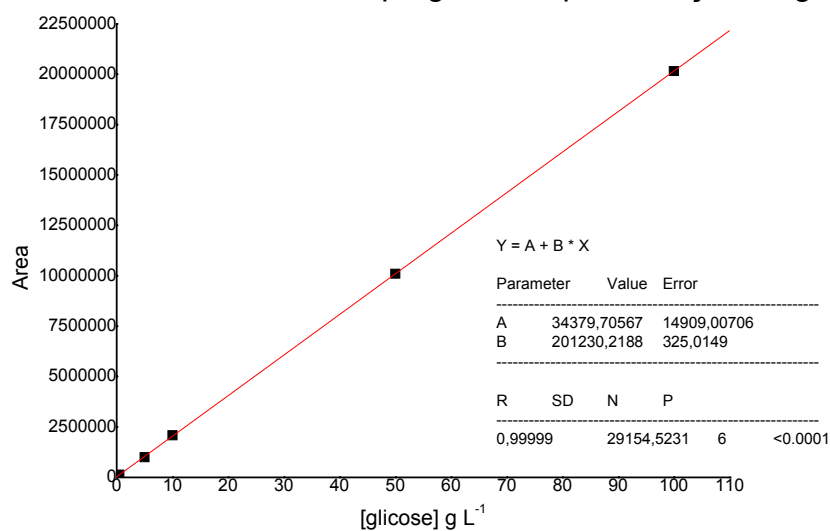
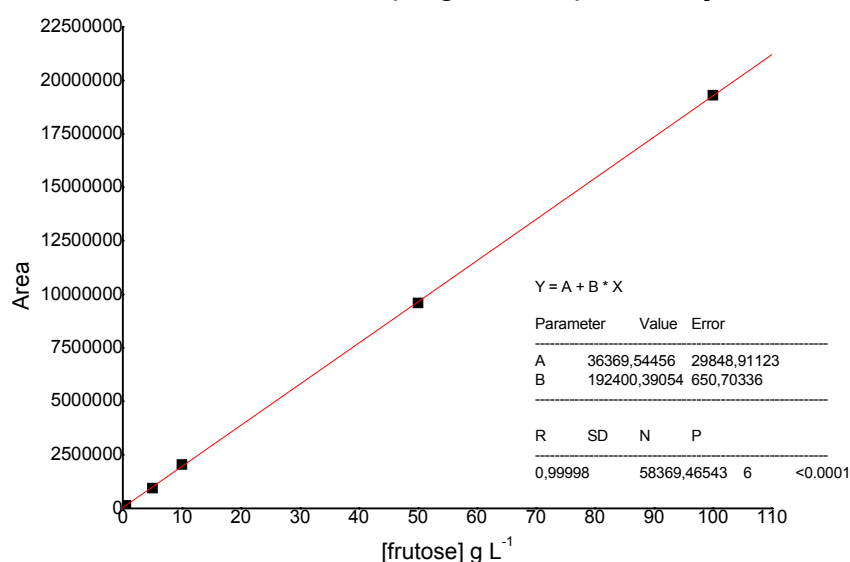
Ensaio	Fatores				Microondas			Agitação		
	1	2	3	4	Sac	Gli	Fru	Sac	Gli	Fru
2	+1	-1	-1	-1	97,61	97,54	102,01	99,89	95,80	100,86
4	+1	1	-1	-1	98,10	97,52	103,12	103,66	100,56	101,06
6	+1	-1	1	-1	96,50	94,92	100,86	97,43	96,04	97,84
8	+1	1	1	-1	98,73	97,27	97,79	97,81	98,23	104,16
10	+1	-1	-1	1	98,45	100,50	101,20	95,00	91,12	92,56
12	+1	1	-1	1	94,20	97,35	96,00	95,60	94,00	93,42
14	+1	-1	1	1	96,53	98,98	99,10	94,80	90,86	92,45
16	+1	1	1	1	93,30	92,10	89,45	93,78	95,58	90,12
17 (PC)	0	0	0	0	99,10	98,21	101,99	101,40	96,98	102,47
18 (PC)	0	0	0	0	98,90	97,30	100,29	99,78	97,10	100,60
19 (PC)	0	0	0	0	99,25	99,00	99,30	98,50	97,68	99,85
<b>Média</b>					<b>97,33</b>	<b>97,34</b>	<b>99,19</b>	<b>97,97</b>	<b>95,81</b>	<b>97,76</b>
<b>Desvio Padrão</b>					<b>2,01</b>	<b>2,23</b>	<b>3,83</b>	<b>3,06</b>	<b>2,91</b>	<b>4,78</b>
<b>DPR (%)</b>					<b>2,07</b>	<b>2,29</b>	<b>3,80</b>	<b>3,13</b>	<b>3,04</b>	<b>4,89</b>

**Variáveis (Fatores):** 1 – Técnica extrativa: aplicada(+1); não utilizada(0); aplicada(-1); 2 – Tempo de extração em minutos: 30(-1); 60(0); 90(+1); 3 – Temperatura de extração em °C: 30(-1); 45(0); 60(+1); 4 – Quantidade de café verde em mg: 300 (-1); 400 (0); 500(+1).

A determinação da quantidade de açúcares livres no café verde, segundo o planejamento experimental, foi feita a partir das curvas de calibração para sacarose, glicose e frutose, mostradas nas Figuras 10, 11 e 12, respectivamente.

**Figura 10** - Curva analítica empregada na quantificação da sacarose



**Figura 11 - Curva analítica empregada na quantificação da glicose****Figura 12 - Curva analítica empregada na quantificação da frutose**

## 4.2 PLANEJAMENTO FATORIAL E TRATAMENTO MATEMÁTICO

Os resultados para os ensaios, variando-se as condições de extração empregando o microondas e a agitação orbital, seguindo o planejamento fatorial  $2^4$  com triplicata no ponto central, estão apresentados na Tabela 10.

A concentração total, dada em  $\text{g L}^{-1}$ , refere-se ao somatório de sacarose, glicose e frutose. Os ensaios ímpares apresentaram as mesmas condições das amostras pares que os sucedem, porém não aplicaram as técnicas, os quais foram considerados como os controles ou testemunhas.

Na Tabela 10, também é apresentada a técnica que mais extraiu açúcares, em relação a concentração obtida sem o uso da técnica (controle).

Os rendimentos de extração foram feitos pela diferença entre o valor obtido aplicando o microondas e a agitação, e o seu respectivo controle.

O planejamento fatorial realizado foi do tipo sem repetições, sendo que o desvio padrão dos resultados, foi estimado a partir da triplicata no ponto central, para ambas as técnicas.

**Tabela 10** - Rendimento da extração dos açúcares livres em café verde, empregando as técnicas de microondas e agitação orbital. Ensaios ímpares - controles (sem aplicação das técnicas), nas mesmas condições dos ensaios pares que os sucedem – aplicando microondas e agitação orbital

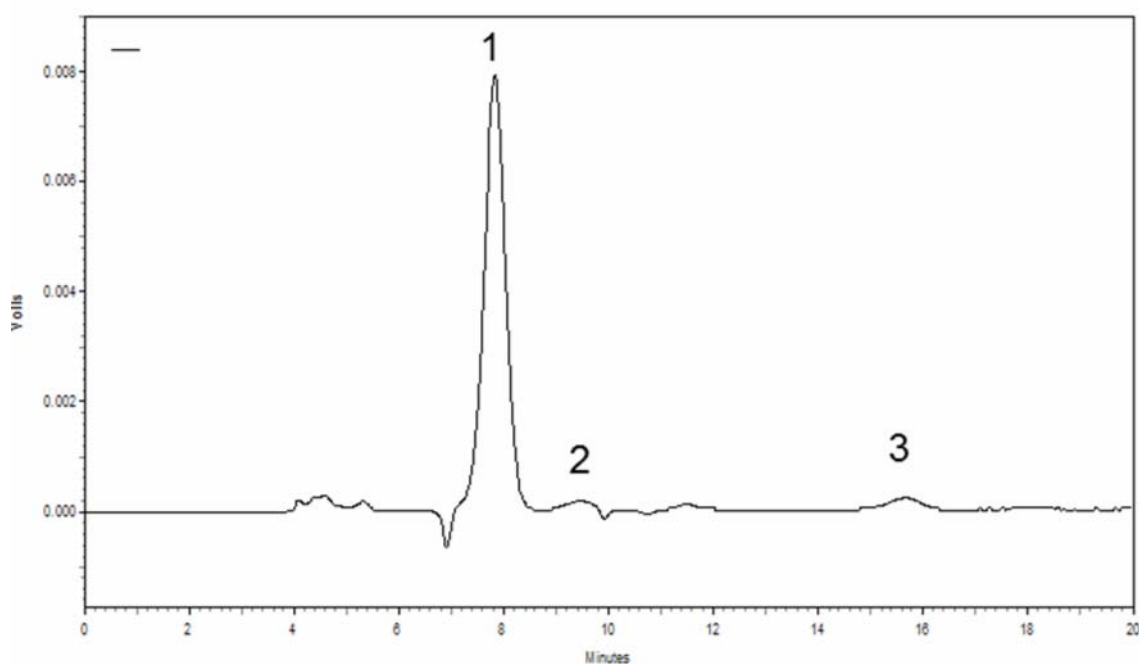
Ensaio	Fatores				Concentração Total (g L <sup>-1</sup> )			Maior extração
	1	2	3	4	Controle	Microondas	Agitação	
1	-1	-1	-1	-1	1,439			
2	+1	-1	-1	-1		1,613	2,202	Agitação
3	-1	+1	-1	-1	1,546			
4	+1	+1	-1	-1		1,357	1,433	Agitação
5	-1	-1	+1	-1	1,595			
6	+1	-1	+1	-1		1,844	0,983	Microondas
7	-1	+1	+1	-1	1,480			
8	+1	+1	+1	-1		1,532	1,237	Microondas
9	-1	-1	-1	+1	2,393			
10	+1	-1	-1	+1		2,434	1,925	Microondas
11	-1	+1	-1	+1	2,407			
12	+1	+1	-1	+1		2,041	0,799	Microondas
13	-1	-1	+1	+1	1,935			
14	+1	-1	+1	+1		1,354	1,737	Agitação
15	-1	+1	+1	+1	0,805			
16	+1	+1	+1	+1		2,873	2,572	Microondas
17 (PC)	0	0	0	0		1,023	1,148	Agitação
18 (PC)	0	0	0	0		0,966	1,250	Agitação
19 (PC)	0	0	0	0		0,912	1,175	Agitação
<b>Média do ponto central</b>						<b>0,967</b>	<b>1,191</b>	
<b>Desvio Padrão do PC</b>						<b>0,056</b>	<b>0,053</b>	
<b>DPR (%) do PC</b>						<b>5,74</b>	<b>4,44</b>	

**Variáveis (Fatores):** 1 – Técnica extrativa: aplicada(+1); não utilizada(0); aplicada(-1); 2 – Tempo de extração em minutos: 30(-1); 60(0); 90(+1); 3 – Temperatura de extração em °C: 30(-1); 45(0); 60(+1); 4 – Quantidade de café verde em mg: 300 (-1); 400 (0); 500(+1).

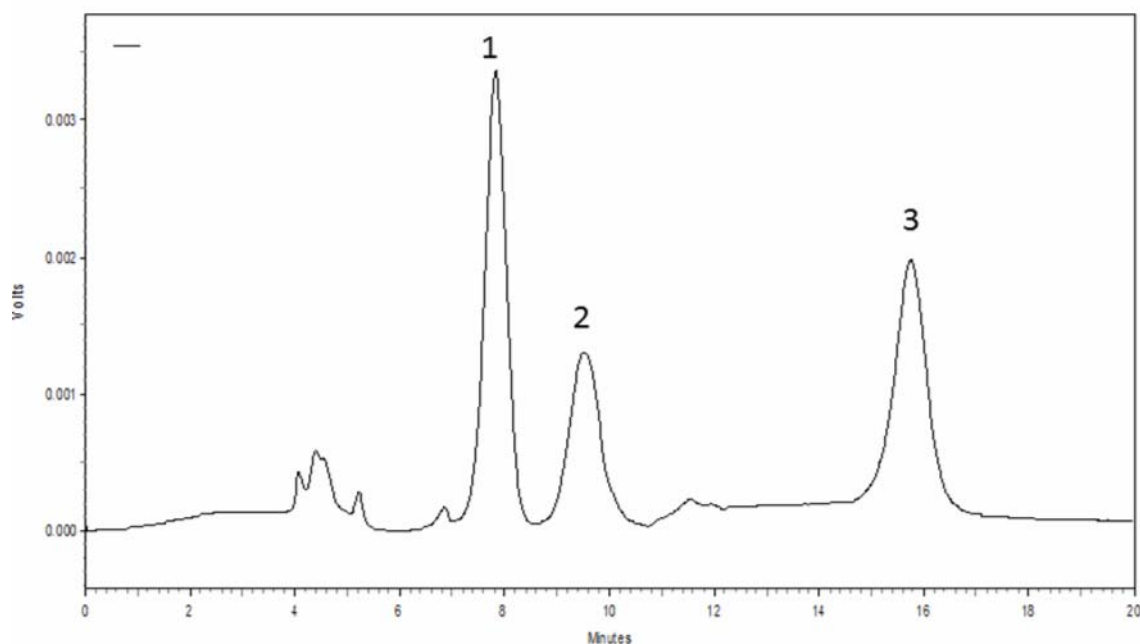
Os cromatogramas do café verde, apresentaram um alto teor de sacarose, concordando com os resultados de Rogers et al. (1999) e Redgwell e Fischer (2006), com teores que variaram de 1,19 a 2,72 g L<sup>-1</sup>, para microondas e, de 0,65 a 2,39 g L<sup>-1</sup>, para agitação orbital. Os resultados de glicose e frutose apresentaram-se bem menores variando de 0,08 a 0,12 g L<sup>-1</sup>, como é esperado para grãos maduros.

As análises do café verde, apresentadas na Tabela 10, mostram que a condição: 90 min, 60°C e 500,0 mg, empregadas nos ensaios 15 e 16, foram as mais contrastantes, as quais estão apresentadas nas Figuras 13, 14 e 15.

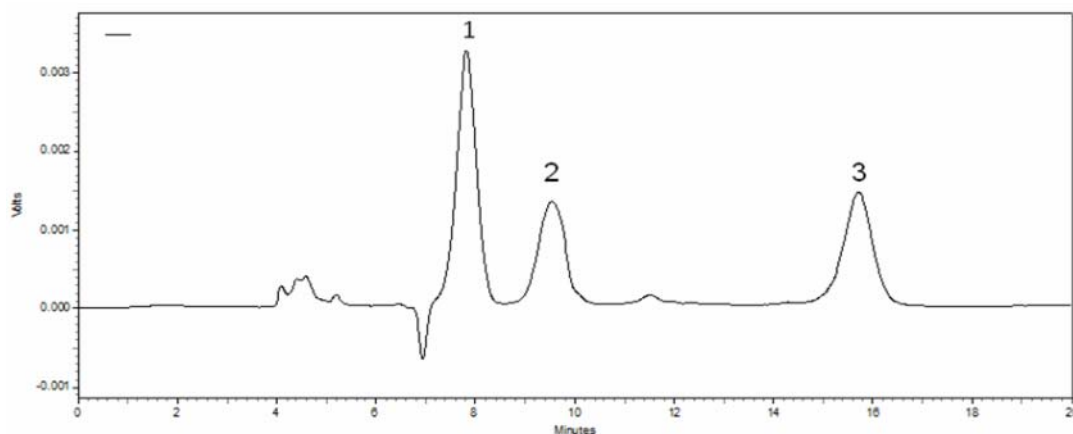
**Figura 13** - Cromatograma de carboidratos livres na amostra de café verde, sem submeter as técnicas de microondas e agitação orbital (Ensaio **15** - Condição: 90 min; 60°C; 500,0 mg – Amostra Controle). Picos: (1) sacarose; (2) glicose e (3) frutose



**Figura 14** - Cromatograma de carboidratos livres na amostra de café verde, extraído por microondas (Ensaio 16 - Condição: 90 min; 60°C; 500,0 mg). Picos: (1) sacarose; (2) glicose e (3) frutose



**Figura 15** - Cromatograma de carboidratos livres na amostra de café verde, extraído por agitação orbital (Ensaio 16 - Condição: 90 min; 60 °C; 500,0 mg). Picos: (1) sacarose; (2) glicose e (3) frutose



Observa-se uma ligeira diferença na amplitude, e nas áreas dos picos, das Figuras 14 e 15, o que justifica a maior concentração de açúcares livres extraídos por microondas.

A partir destes resultados, foi possível calcular o intervalo de confiança para os efeitos principais e de interação, que estão apresentados nas Tabela 11 e 12.

Para calcular o intervalo de confiança (I.C.) dos resultados, fez-se uso da Equação 5.

$$I.C. = \text{Efeito} \pm t_{n-1} \cdot s \quad \text{Eq. 5}$$

Onde:

*Efeito*: é a média dos resultados obtidos dos ensaios referenciados com os sinais positivos subtraída da média dos resultados obtidos dos ensaios referenciados com os sinais negativos;

*s*: é o desvio padrão dos efeitos; dado pela a estimativa do erro experimental, calculado por  $s = \sqrt{V(\text{efeito})}$ ;

*V (efeito)*: variância dos efeitos, que em um planejamento  $2^4$ , pode ser utilizada a média dos valores de todos os efeitos, ou somente das interações terciárias ou quaternárias, quando consideradas de baixa influência no estudo;

$t_{n-1}$ : parâmetro *t*-student, a um determinado erro, que neste caso é adotado  $\alpha = 0,05$  ou 95% de confiança, e 14 graus de liberdade (15 efeitos -1), ou seja,  $t_{0,05;14} = 2,14$

Os resultados calculados para o intervalo de confiança, mostra que nenhum dos efeitos principais ou de interações, foram significativos, para o microondas (Tabela 11).

**Tabela 11** - Intervalos de confiança dos efeitos principais e de interação, para um planejamento fatorial  $2^4$ , a partir da extração por microondas

Variáveis de extração		Intervalo de confiança (95%)	Observação
<b>Fatores</b>	<b>Efeitos Principais</b>		
1	Técnica	0,061 ± 0,188	
2	Tempo	- 0,024 ± 0,188	
3	Temperatura	- 0,075 ± 0,188	
4	Massa amostral	0,160 ± 0,188	
	<b>Efeitos das Interações</b>		
	1 x 2	0,070 ± 0,188	
	1 x 3	0,088 ± 0,188	
	1 x 4	0,036 ± 0,188	
	2 x 3	0,021 ± 0,188	
	2 x 4	0,025 ± 0,188	
	3 x 4	- 0,117 ± 0,188	
	1 x 2 x 3	0,134 ± 0,188	
	1 x 2 x 4	0,117 ± 0,188	
	1 x 3 x 4	0,063 ± 0,188	
	2 x 3 x 4	0,043 ± 0,188	
	1 x 2 x 3 x 4	0,121 ± 0,188	

Para agitação orbital, somente a interação entre a técnica, temperatura e quantidade de amostra se mostrou significativa, para a extração dos 3 açúcares (Tabela 12).

**Tabela 12** - Intervalos de confiança dos efeitos principais e de interação, para um planejamento fatorial  $2^4$ , a partir da extração por agitação orbital

Variáveis de extração		Intervalo de confiança (95%)	Observação
<b>Fatores</b>	<b>Efeitos Principais</b>		
1	Técnica	- 0,030 ± 0,197	
2	Tempo	- 0,080 ± 0,197	
3	Temperatura	- 0,075 ± 0,197	
4	Massa amostral	0,111 ± 0,197	
<b>Efeitos das Interações</b>			
	1 x 2	0,013 ± 0,197	
	1 x 3	0,089 ± 0,197	
	1 x 4	- 0,013 ± 0,197	
	2 x 3	0,067 ± 0,197	
	2 x 4	0,035 ± 0,197	
	3 x 4	0,035 ± 0,197	
	1 x 2 x 3	0,181 ± 0,197	
	1 x 2 x 4	0,056 ± 0,197	
	1 x 3 x 4	0,215 ± 0,197	Significativo
	2 x 3 x 4	0,001 ± 0,197	
	1 x 2 x 3 x 4	0,078 ± 0,197	

A partir desses dados, pode-se construir um gráfico de probabilidades cumulativas, no qual foi utilizado o Teorema do Limite Central, juntamente com a aleatoriedade dos experimentos, e os 15 valores podem ser considerados como uma amostra aleatória, retirada de uma distribuição aproximadamente normal, com média populacional igual a zero, em que cada elemento tem a mesma importância. Assim sendo, para 15 elementos ou efeitos, cada dado representará 1/15 (6,67%) da área total da distribuição (BARROS, SCARMINIO, BRUNS, 2001).

Para a construção do gráfico, utiliza-se o efeito calculado no eixo da abscissa, e o ponto médio da região de probabilidade cumulativa, correspondente ao mesmo no eixo da ordenada.

Aplicando a função logaritmo aos efeitos, pode-se construir os gráficos normais, e verificar se os pontos obedecem a uma mesma distribuição (amostra aleatória com média populacional igual a zero), observado quando estes

estão alinhados como em uma reta, mostrando que os elementos têm a mesma importância.

Para proceder a análise de probabilidade acumulativa, colocam-se os efeitos em ordem crescente, conforme dispostos nas Tabelas 13 e 14 e nas Figuras 16 e 17.

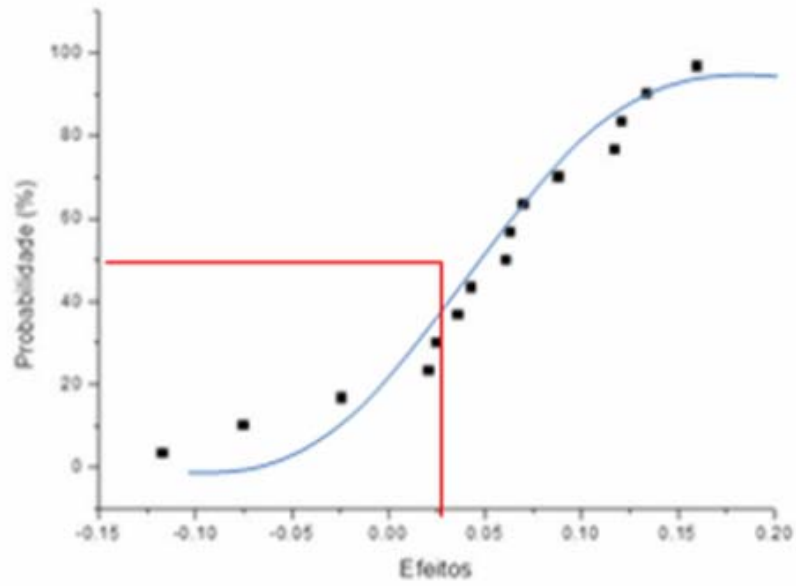
**Tabela 13** – Probabilidade acumulada da distribuição normal dos efeitos obtidos pelo planejamento fatorial para a técnica de microondas

Ordem	Microondas		Região de probabilidade acumulativa (%)	Ponto Central
	Efeito	Log (efeito)		
1	- 0,117	-0,931814138	0,00 – 6,67	3,33
2	- 0,075	-1,124938737	6,67 – 13,33	10,00
3	- 0,024	-1,619788758	13,33 – 20,00	16,67
4	0,021	-1,677780705	20,00 – 26,67	23,33
5	0,025	-1,602059991	26,67 – 33,33	30,00
6	0,036	-1,443697499	33,33 – 40,00	36,67
7	0,043	-1,366531544	40,00 – 46,67	43,33
8	0,061	-1,214670165	46,67 – 53,33	50,00
9	0,063	-1,200659451	53,33 – 60,00	56,67
10	0,070	-1,154901960	60,00 – 66,67	63,33
11	0,088	-1,055517328	66,67 – 73,33	70,00
12	0,117	-0,931814138	73,33 – 80,00	76,67
13	0,121	-0,917214630	80,00 – 86,67	83,33
14	0,134	-0,872895202	86,67 – 93,33	90,00
15	0,160	-0,795880017	93,33 – 100,00	96,67

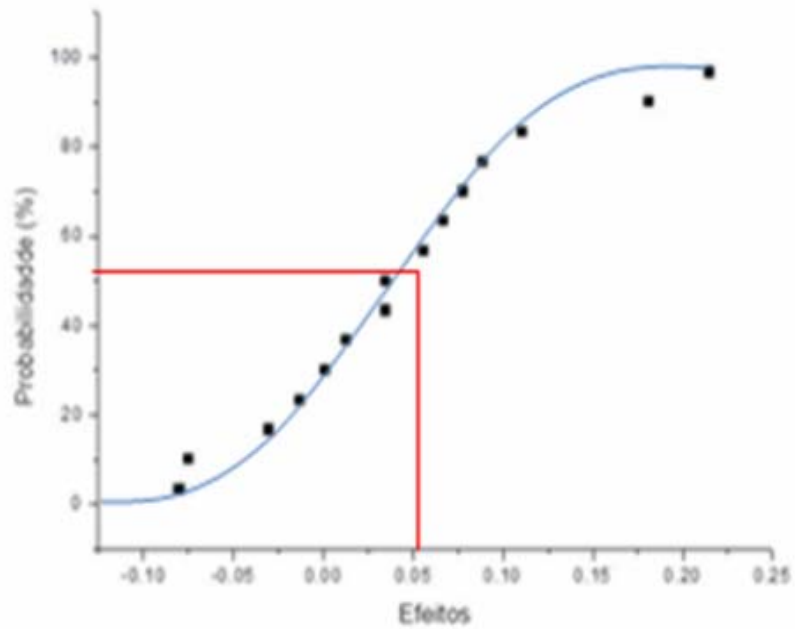
**Tabela 14** – Probabilidade acumulada da distribuição normal dos efeitos obtidos pelo planejamento fatorial para a técnica de agitação orbital

Ordem	Agitação orbital		Região de probabilidade acumulativa (%)	Ponto Central
	Efeito	Log (efeito)		
1	- 0,080	-1,096910013	0,00 – 6,67	3,33
2	- 0,075	-1,124938737	6,67 – 13,33	10,00
3	- 0,030	-1,228787450	13,33 – 20,00	16,67
4	- 0,013	-1,886056648	20,00 – 26,67	23,33
5	0,001	-3,000000000	26,67 – 33,33	30,00
6	0,013	-1,886056648	33,33 – 40,00	36,67
7	0,035	-1,455931956	40,00 – 46,67	43,33
8	0,035	-1,455931956	46,67 – 53,33	50,00
9	0,056	-1,251811973	53,33 – 60,00	56,67
10	0,067	-1,173925197	60,00 – 66,67	63,33
11	0,078	-1,107905397	66,67 – 73,33	70,00
12	0,089	-1,050609993	73,33 – 80,00	76,67
13	0,111	-0,954677021	80,00 – 86,67	83,33
14	0,181	-0,742321425	86,67 – 93,33	90,00
15	0,215	-0,667561540	93,33 – 100,00	96,67

**Figura 16** – Gráficos das probabilidades acumuladas para os 15 efeitos obtidos do tratamento experimental (a) microondas e (b) agitação orbital

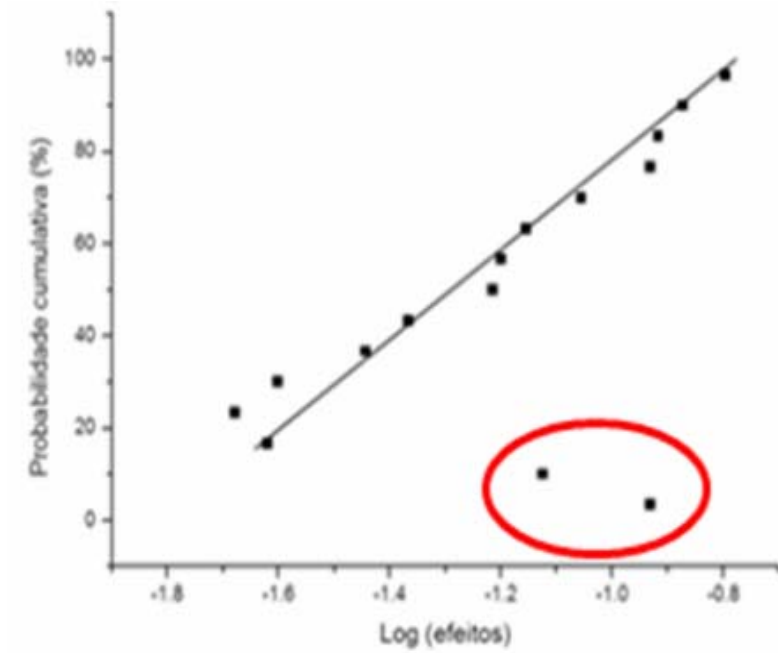


(a)

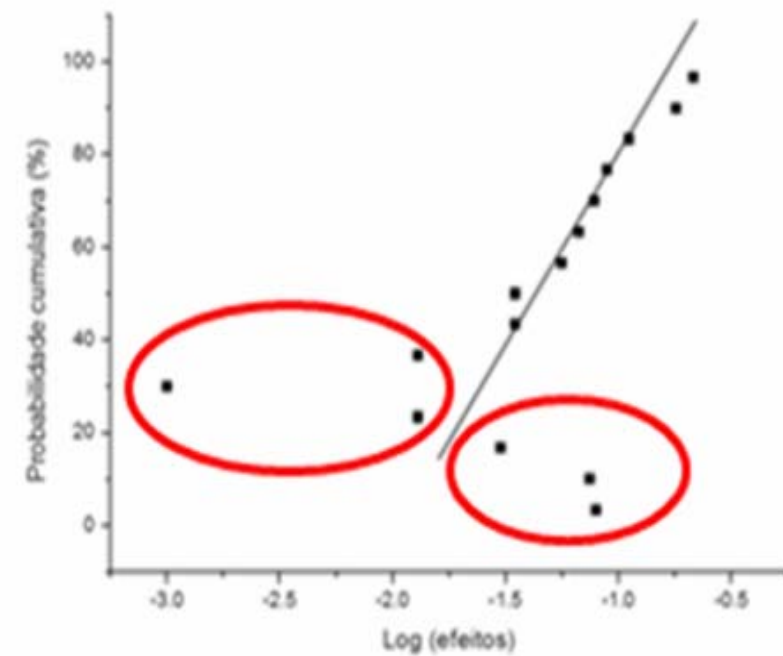


(b)

**Figura 17** – Gráficos normais para os 15 efeitos obtidos do tratamento experimental (a) microondas e (b) agitação orbital



(a)



(b)

A partir dos gráficos anteriores (Figura 16 (a) e (b)), observa-se que os pontos para a agitação orbital ficaram mais bem distribuídos, em torno da região próxima da probabilidade cumulativa de 50% (eixo Y) e intervalo dos efeitos próximos da média (eixo X), fazendo alusão a uma distribuição normal, em que a maioria dos dados devem estar na região central da curva gaussiana, comparado ao microondas.

Em uma análise mais ampla, é possível inferir que a técnica de agitação apresenta um maior número de efeitos distribuídos de forma aleatória, e menor contribuição de erros sistemáticos, devido a efeitos balanceados em torno da reta.

Observando a Figura 14 e 15, é possível perceber que a homogeneidade dos resultados, é mais evidente na técnica de agitação (Figuras 14 e 15 (b)), e conseqüentemente, a melhor distribuição normal dos mesmos e a aleatoriedade dos resíduos, em torno da reta.

Para verificar a significância da influência das variáveis quantitativas (temperatura, tempo e massa amostral), comparando os resultados submetidos às técnicas e sem o uso das técnicas (controle), utilizou-se o teste *t*-pareado, e calculou-se o intervalo de confiança, através da Equação 6.

$$I.C. = \bar{x} \pm t_{n-1} \cdot \frac{s_d}{\sqrt{n}} \quad Eq.6$$

Onde:

- $\bar{x}$ : corresponde as médias dos resultados submetidos às mesmas condições, que neste caso, são os mesmos ensaios para microondas e agitação orbital (4 ensaios com aplicação da técnica e 4 controles);
- $t_{n-1}$ : parâmetro de *t*-student, a um dado valor de significância, que neste caso é  $\alpha = 0,05\%$  e  $t_{0,05;3} = 3,18$ ;
- $s_d$ : desvio padrão das diferenças entre as médias.

Este teste é usado para definir o nível de semelhança ou diferença entre dois momentos de uma mesma amostra ou população. Ao contrário do teste *t* "comum", que compara as médias e as variâncias, esse teste estuda as diferenças entre 2 situações de uma mesma população (BOX, HUNTER, HUNTER, 1978).

As observações pareadas são utilizadas em situações em que a unidade amostral é o seu próprio controle, diminuindo assim o efeito de variações individuais (ROSNER, 1995).

O teste consiste em determinar, primeiro, a diferença entre cada par de valores, e então testar se as médias das diferenças é igual a zero.

A aplicação dos testes e o respectivos intervalos de confiança, obtidos para cada caso, podem ser vistos nas Tabelas 15 e 16.

**Tabela 15** – Intervalo de confiança obtidos pelo teste *t*-pareado para os tratamentos submetidos ao microondas

Variáveis Quantitativas		Intervalo de confiança (95%)
		Com microondas
Temperatura (°C)	30	1,86 ± 0,69**
	60	1,90 ± 3,33
Tempo (min)	30	1,81 ± 1,05**
	90	1,95 ± 3,27
Massa amostral (mg)	300,0	1,59 ± 0,55**
	500,0	2,18 ± 3,43

\*\*Valores significativos a 5% de erro

**Tabela 16** – Intervalo de confiança obtidos pelo teste *t*-pareado para os tratamentos submetidos a agitação orbital

Variáveis Quantitativas		Intervalo de confiança (95%)
		Com agitação
Temperatura (°C)	30	1,59 ± 2,86
	60	1,63 ± 2,99
Tempo (min)	30	1,71 ± 1,74
	90	1,51 ± 3,82
Massa amostral (mg)	300,0	1,47 ± 1,61
	500,0	1,76 ± 3,87

\*\*Valores significativos a 5% de erro

Foram considerados significativos os resultados quando:

$$\bar{x} > t_{n-1} \cdot \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

Já que estes expressam uma maior extração, em uma determinada condição.

Estes resultados indicam que:

- Utilizando microondas, verificou-se um aumento significativo dos açúcares extraídos em 30°C, com 30 minutos e utilizando 500,0 mg de amostra, porém isto também foi observado, realizando a extração em repouso (controle).
- Utilizando agitação orbital, observou-se que em nenhum dos níveis, a extração dos açúcares foi significativa, quando comparada ao controle.

## 5 CONCLUSÕES

O método desenvolvido e validado empregando cromatografia líquida com índice de refração mostrou-se adequado para determinação dos carboidratos livres – sacarose, glicose e frutose, sendo: preciso, linear em uma ampla faixa dinâmica, seletivo, específico, exato com recuperação dentro dos limites aceitáveis para as 2 técnicas, com limites de detecção e quantificação compatíveis com os teores das amostras de café verde analisadas.

Em termos de extração, as melhores condições de análise foram obtidas fazendo uso da agitação orbital e microondas, utilizando os maiores níveis selecionados: 90 minutos, 60°C e 500,0 mg. No caso de se optar pelos níveis menores (30 minutos, 30°C e 300,0 mg), somente o emprego do microondas se mostrou mais preciso e com maiores rendimentos.

Este estudo ainda exige definições das condições ótimas de extração, aplicando um planejamento fatorial do tipo “estrela” e construção de uma superfície de resposta.

Este estudo preliminar, serviu de base para a seleção da agitação orbital, como técnica preferencial de extração de carboidratos livres em café verde, a ser adotada em estudos subsequentes. Este estudo é um passo inicial na busca de novas formas de extração de carboidratos, fazendo uso de equipamentos e condições de análise, que sejam viáveis na rotina de um laboratório de pesquisa e na indústria de alimentos.

## REFERÊNCIAS

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 5 jun. 2012.

AGRESTI, P. D. C. M., FRANCA A. S., OLIVEIRA, L. S. , AUGUSTI R. Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile. **Food Chemistry**, v.106, n.2, p.787-796, 2008.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. DE; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. **Química orgânica**. Rio de Janeiro, RJ, p.621, 1976.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, p.684 , 1990.

BANDEIRA, R. D. C. C; TOCI, A. T.; TRUGO, L. C.; FARAH, A. Composição volátil dos defeitos intrínsecos do café por CG/EM headspace. **Química Nova**, v.32, n.2, p.309-314, 2009.

BARRIADA, M. P.; GONZALES, M. J. C.; MUNIATEGUILORENZO, S.; LOPEZ, L. M., PRADA, D. P. R, FERNANDEZ, E. F. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for determination of organochlorine pesticides in vegetables. **Talanta**, v.71, p.1345-1351, 2007.

BARROS, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Editora da Unicamp: Campinas, SP, 2001.

BARTHOLO, G. F.; GUIMARÃES, P. T. G. Cuidados na colheita e preparo do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.33-42, 1997.

BLATT, C. R. **Análise de carboidratos por cromatografia em fase gasosa**. 1987. 104p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BOX, G. E. P; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters - An Introduction to design, data analysis, and model building**. New York, John Wiley & Sons, 1978.

BRASIL. Instrução normativa nº 8, de 11 de junho de 2003. Regulamento técnico de identidade e de qualidade para a classificação do café beneficiado grão cru. Disponível em <[http://www.abic.com.br/arquivos/leg\\_instnormativa08\\_2003.pdf](http://www.abic.com.br/arquivos/leg_instnormativa08_2003.pdf)> Acesso em: 28 jan. 2010.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução - CNNPA nº 12, de 1978. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de julho de 1978. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_78\\_cafe\\_cru.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_cafe_cru.htm)>. Acesso em: 20 fev. 2013

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução - RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1, p. 56-59.

BRITO, C. J. F. A.; RODELLA, A. R.; DESCHAMPS, F. C. Perfil Químico da Parede Celular e suas Implicações na Digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.183534-184439, 2003.

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de Reserva da Parede Celular em Semente, Estruturas, Metabolismo, Funções e Aspectos Ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v.12, edição especial, p.137-162, 2000.

BUCKHOUT, T.J.; TUBBE, A. **Structure, mechanisms of catalysis, and regulation of sugar transporters in plants**. In: Samski, E.; Schaffer, A. A. Photoassimilate distribution in plants and crops: sourcesink relationships. New York: Marcel Dekker, Inc, p.229260, 1996.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M. A. Development of a HPLC/DIODE-ARRAY detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.21, n.20, p.3187-3195, 1998.

CASLER, M. D.; HATFIELD, R. D. Cell wall composition of smooth brome grass plants selected for divergent fiber concentration. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.54, n.21, p.8206-8211, 2006.

CHAGAS, S. J. R. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de minas Gerais**. Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – ESALQ, Dissertação de Mestrado, p. 85, 1994.

CIOLA, R., Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho. São Paulo, Edgard Blücher. 1998.

CLIFFORD, M. N. The composition of green and roasted coffee beans. **Process Biochemistry**, p. 13-19, 1975.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Campinas, Unicamp, p.279, 1990.

COUTINHO, L. F. M. **Desenvolvimento de Sistema Instrumental para Determinação de Carboidratos em Café Solúvel Utilizando HPAE-PAD**. Trabalho de Conclusão de Curso, UEL, 2003.

DEAN, J. R.; **Extraction Methods for Environmental Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1998.

DELGADO, P. A. **Desenvolvimento de processo enzimático para redução de sedimentos em extratos de café solúvel**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

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

DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; CZELUSNIAK, C. NOGUEIRA, A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. Ponta Grossa. **Exact and Soil Science, Agrarian and Engineering**. v.8, n.1, p.65-78, 2002.

DIONEX. Technical Note 20. **Analysis of carbohydrates by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)**. Disponível em: < [http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5023-TN20\\_LPN032857-04.pdf](http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5023-TN20_LPN032857-04.pdf)>. Acesso em: 18 jun. 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for determination of sugars and related compounds. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p. 350-356, 1956.

FISCHER, M.; REIMANN, S.; TROVATO, V.; REDGWELL, R.J.; Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. **Carbohydrates Research**, v.330, p.93-101, 2001.

FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F.; OLIVEIRA, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. **Food Science and Technology**, v.38, n.7, p.709-715, 2005.

GARCIA, L. M. Z., PAULI, E. D., CRISTIANO, V., CAMARA, C. A. P. da, SCARMÍNIO, I. S., NIXDORF, S. L. Chemometric evaluation of adulteration profile in coffee due to corn and husk by determining carbohydrates using HPAEC-PAD. **Journal of Chromatographic Science**, v.47, p.825 - 832, 2009.

GOMEZ, B. J. A.; GARCIA, V. R. J.; ELVIRA, G. S.; GONZÁLEZ, P. A. M.; Optimization of the capillary gas chromatographic analysis of mono- and oligosaccharides in honeys. **Chromatographia**, v.50, p.461, 1999.

HODGE, J.E.; HODFREITER, B.R. **Determination of reducing sugars and carbohydrate**. In: WILSTER, R.C.; WOLFRON, M.I. (eds.) *Methods in carbohydrates chemistry*. New York. Academic Press., v.1. p.380398, 1962.

HOFFMANN, C.E. **Resfriamento no processo de torra nas características de qualidade tecnológica e sensorial do café**. 2001.86f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA – INMETRO. Normalização e qualidade industrial. **Orientações sobre validação de métodos de analíticos**. DOQ-CGCRE-008. 2011. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2012.

\_\_\_\_\_. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS. DOQ-CGCRE-008. 2007. Disponível em:

<[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2012.

INOUE, K., KITAHARA, K., AIKAWA, Y., ARAI, S.; MASUDA-HANADA, T. HPLC Separation of All Aldopentoses and Aldohehexoses on an Anion-Exchange Stationary Phase Prepared from Polystyrene-Based Copolymer and Diamine: The Effect of NaOH Eluent Concentration. **Molecules**. v.16, p.5905-5915, 2011.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **SELECTIVITY IN ANALYTICAL CHEMISTRY (IUPAC Recommendations 2001)**. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 73, No. 8, pp. 1381–1386, 2001.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology (2005). **ICH Secretariat, c/o IFPMA, 30 rue de St - Jean, P.O. Box 758, 1211 Geneva 13, Switzerland**. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf)>. Acesso em: 6 out. 2012.

JAGER, A. V.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v.30, n.4, p.586, 2007.

KITZBERGER, C. S. G. **Caracterização e discriminação de cafés arábica de diferentes variedades cultivados nas mesmas condições edafoclimáticas** – Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, Ed. Rima, 62 p., 2004.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 4th ed. New York: Worth Publishers, 2006.

MAESTRE, E.; KATAKIS, I.; NARVÁEZ, A.; DOMÍNGUEZ, E. A multianalyte flow electrochemical cell: application to the simultaneous determination of carbohydrates based on bioelectrocatalytic detection. **Biosensors and bioelectronics**, v.21, p.774, 2005.

MANDEBVU, P.; WEST, J. W.; HILL, J. M.; GATES, R. N.; HATFIELD, R. D.; MULLINIX, B. G.; PARKS, A. H.; CAUDLE, A. B. **Journal Animal Science**, v.77, p.1572 - 1586, 1999.

MATOS, R. C.; MATOS, M. A. C.; OLIVEIRA, A. C. A.; ASSIS, V. C. Flow-injection system with glucose oxidase immobilized on a tubular reactor for determination of glucose in blood samples. **Analytica Chimica Acta**, v.535, n.1-2, p. 213, 2005.

NAZARIO, C. E. D. **Desenvolvimento e caracterização de materiais baseados em sílica com aplicabilidade em extração em fase sólida e cromatografia**

**Líquida de ultra alta eficiência.** 2013. 215f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de São Paulo, São Carlos, SP.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry.** v.153, p.375380, 1944.

MILO, C. ; BADOUD, R. ; FUMEAUX, R. ; BOBILLOT, S.; FLEURY, Y. ; HUYNHBA, T. Coffee flavour of water non extractable green bean components to roasted coffee flavour. **19<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science**, Trieste, Italia, 2001.

OLIVEIRA, C.C., SARTINI, R.P., ZAGATTO, E.A.G. Microwave-assisted sample preparation in sequential injection: Spectrophotometers determination of magnesium, calcium and iron in food. **Analytica Chimica Acta**, v.413, p.41- 48, 2000.

PAULI, E. D., CRISTIANO, V., NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**, v.34, n.4, 689-694, 2011.

PEDRÓN, S. C., HALKO, R., FERRERA, Z. S., RODRIGUEZ, J. J. S. Combination of microwave assisted micelar extraction and liquid chromatography for the determination of organophosphorous pesticides in soil samples. **Journal of Chromatography A**, v.1078, p.13-21, 2005.

PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS. Disponível em:  
<<http://www.produtosparalaboratorio.com.br/incubadora-de-bancada-com-agitacao-shaker>>. Acesso em: 6 fev. 2013.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; Eichhorn, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Ed, Guanabara Koogan, 2001. 906p.

REDGWELL, R; FISCHER, M. Coffee carbohydrates. **Journal Brazilian Plants Physiology**, v.18, p.165-174, 2006.

ROGERS, W. J.; MICHAUX, S., BASTIN, M.; BUCHELI, P. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, v.149, p.115-123, 1999.

ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**. 4<sup>a</sup> ed., New York, Duxbury Press, 1995.

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

SCHOLZ, M. B. S.; PRETE, C. E. C.; CRUDI, E.; MAGRI, T. B. Composição química de variedade de café (*Coffea Arabica*). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1, 2000, Poços de Caldas. **Anais**. Poços de Caldas: Pálace Cassino, p. 673-676. 2000.

SHEWMAKER, G. E.; MAYLAND, H. F.; ROBERTS, C. A.; HARRISON, P. A.; CHATTERTON, N. J.; SLEPER, D. A.; Daily carbohydrate accumulation in eight tall fescue cultivars. **Journal Compilatio – Blackwell Publishing Ltd. Grass and Forage Science**, v.61, p.413, 2006.

SILWAR, R.; LÜLLMANN, C..The determination of mono and disaccharides in green arabica and robusta coffees using high performance liquid chromatography. **Café Cacao Thé**, v.32, n.4, p. 319-322, 1988.

SILVETZ, M. Chemical properties of coffee. **Coffee Processing Technology**, Westport, v.2, p.162-186, 1963.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J., High-Performance Liquid Chromatography In: Principles of Instrumental Analysis, 4 ed., Flórida: Harcourt Brace College Publishers, p. 628 – 669, 1992.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2 ed., New York : John Wiley & Sons, 1979.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v.95, p.19-23, 1952.

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

TRUGO, L. C. **Carbohydrates**. In: Coffee (eds. R. J. Clarke e R. Macrae). London e New York: Elsevier Applied Science Publishers, cap. 3, p.83-114, 1985.

TUBEROSO, C. I. G.; KOWALCZYK, A.; SARRITZU, E.; CABRAS, P.; Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oil seeds for food use. **Food Chemistry**, v.103, n.4, p.1494-1501, 2007.

VILAS BOAS, B. M.; LICCIARDI, R.; DE MORAIS, A. R.; DE CARVALHO, V.D. Seleção de extratores e tempo de extração para determinação de açúcares em café torrado. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p.1169-1173, 2001.

VILELA, E. R. Secagem e qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.55-63, 1997.

ZWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. **Polish Journal of Environmental Studies**, v.15, n.5, p.677-690, 2006.