

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO LIMPO PARA
ANÁLISE DE 5-HIDROXIMETIL-2-FURFURALDEÍDO
EM MEL**

KARINE CASTOLDI

Dissertação de mestrado
Araraquara 2014

KARINE CASTOLDI

**Desenvolvimento de um método limpo para análise
de 5-hidroximetil-2-furfuraldeído em mel**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientadora: Prof^a. Dra Helena Redigolo Pezza
Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Araraquara
2014

DADOS CURRICULARES

1 Formação Acadêmica

- Graduação

Bacharelado em Química pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) – 2008 a 2011.

- Pós-Graduação

Mestrado em Química Analítica pelo Instituto de Química – UNESP – Araraquara 2012 a 2014

2 Trabalhos apresentados em congressos

1 - XXV Semana da Química E II Jornada de Pós-Graduação da UEL. Londrina – Paraná, 29 de setembro a 02 de outubro de 2009.

Título do trabalho: Pesquisa de alcaloides indólicos de *Aspidosperma polyneuron*.

2 - 33ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia – São Paulo, 28 de maio a 31 de maio de 2010.

Título do trabalho: Antraquinonas isoladas das raízes de *Aspidosperma polyneuron* *Apocynaceae*.

3 - XIX Encontro Anual de Iniciação Científica. Guarapoava – Paraná, 28 a 30 de outubro de 2010.

Título do trabalho: Extração de alcaloides polares de *Aspidosperma polyneuron*.

4 - XX Encontro Anual de Iniciação Científica, X Encontro de Pesquisas da UEPG e I Encontro Anual de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. Ponta Grossa – Paraná, 20 a 22 de outubro de 2011.

Título do trabalho: Extração de alcaloides de *Aspidosperma polyneuron*

5 - 17º Encontro Nacional de Química Analítica. Belo Horizonte – Minas Gerais, 06 a 09 de outubro de 2013.


Título do trabalho: Desenvolvimento de um método limpo para análise de 5-hidroximetil- 2-furfuraldeído em mel.

KARINE CASTOLDI

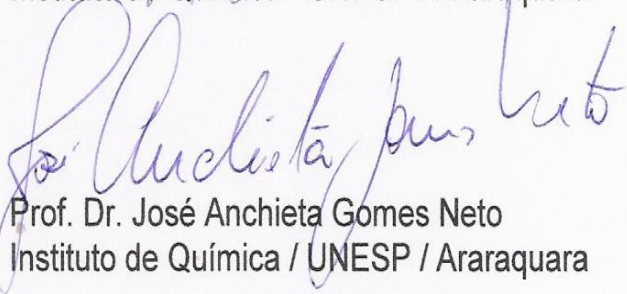
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 29 de agosto de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Helena Redigolo Pezza (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. Matthieu Tubino
Universidade Estadual de Campinas / UNICAMP / Campinas

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho primeiramente a Deus por me ajudar nos momentos difíceis e me ajudar a ter chegado até aqui.

Em segundo lugar a minha família, mãe, pai, irmãos, cunhadas e a minha sobrinha. O meu esforço todo é dedicado a eles, é por eles que eu me mantive firme até o final.

Dedico também aos amigos que me ajudaram a chegar e me manter aqui, muitos foram os tombos, mas sempre estiveram aqui para estender a mão e me ajudar a levantar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, pela minha saúde e por ter me ajudado a passar por mais esta etapa da minha vida.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Helena Redigolo Pezza e ao meu co-orientador Prof. Dr. Leonardo Pezza pela paciência, pela amizade, pelos incentivos e pelo suporte acadêmico.

Aos meus pais Maria Conceição Tamanini Castoldi e João Castoldi e aos meus irmãos, cunhadas e sobrinha, por todo o amor que me deram, por todas as vezes que escutaram meus desabafos e me deram um ombro amigo pra chorar.

Aos meus amigos que estiveram sempre do meu lado pra me dar apoio durante esse período que estive longe de casa.

Aos meus colegas de laboratório por proporcionar vários momentos felizes, muitas risadas e companheirismo no laboratório, eles não foram somente colegas de laboratório, mas se tornaram a minha segunda família dentro da universidade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Um dos indicadores de qualidade do mel é o 5-hidroximetil-2-furfural (HMF). O HMF é produzido pelo aquecimento e envelhecimento do mel. A Comissão Internacional do Mel recomenda três métodos para a determinação do HMF em mel, o método de Winkler, o método de White e a determinação por CLAE. O método de Winkler utiliza a substância carcinogênica p-toluidina, a qual não está de acordo com os princípios da Química Verde. O presente estudo propôs para a determinação de HMF em mel, um método por análise por injeção em fluxo (FIA) usando o método de Winkler modificado, substituindo a p-toluidina por ácido p-aminobenzóico. A faixa linear foi de 1,00 a 40,0 mg L⁻¹, o limite de detecção (LD) foi de 0,43 mg L⁻¹ e o limite de quantificação 1,32 mg L⁻¹. O método é eficiente e mais ambientalmente amigável na análise de HMF em mel.

Palavras Chave: HMF; análise por injeção em fluxo, ácido p-aminobenzóico, mel.

ABSTRACT

One of the quality indicators for honey is 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF). HMF is produced by heating and aging of honey. The International Honey Commission recommends three methods for the determination of HMF in honey: the Winkler method, the White method, and determination by HPLC. The Winkler method uses the carcinogenic substance p-toluidine, which is not in agreement with the principles of Green Chemistry. The present study proposed for the determination of HMF in honey, a flow injection analysis (FIA) method using a modified method of Winkler, replacing p-toluidine for p-aminobenzoic acid. The linear range was 1.00 to 40.0 mg L⁻¹, the limit of detection (LD) was 0.43 mg L⁻¹ and the limit of quantification (LQ) was 1.32 mg L⁻¹. The method is efficient and most environmentally friendly in the analysis of HMF in honey.

Keywords: HMF; flow injection analysis; p-aminobenzoic acid; honey.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Porcentagem da produção brasileira de mel de 2006 a 2011. [Fonte: FEIJÓ et al., 2013]. 15
- Figura 2** - Estrutura do 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF). 18
- Figura 3** - Reação de formação do HMF por desidratação de açúcares em meio ácido, adaptado de Belitz, Grosch e Schieberle (2009, p. 264-265). 19
- Figura 4** - Estrutura p-toluidina. 22
- Figura 5** - Esquema dos sistemas em fluxo. (a) sistema simples; (b) zonas coalescentes. R: reagente; A: amostra; B: bomba peristáltica; Re: resíduo; Br: bobina de reação; D: detector e C: fluido carregador. [Fonte: adaptado de Rocha, Nóbrega e Fatibello Filho (2001) e Růžička e Hansen (1988)]. 25
- Figura 6** - Esquema do sistema de análise em fluxo com zonas coalescentes. R: reagente ($[PABA]=6000 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Ácido barbitúrico}]=1000 \text{ mg L}^{-1}$ e volume=603 μL); CA: fluido carregador ($[\text{HCl}]=0,08 \text{ mol L}^{-1}$); A: amostra (volume=427 μL); B: bomba peristáltica (Vazão=1,9 mL min^{-1}); V: válvula introdutora; De: descarte; C: confluência; Br: bobina de reação (volume=1005 μL) e D: detector. (Fonte: o autor). 30
- Figura 7** - Estrutura dos compostos testados para substituir a p-toluidina (a) PABA (b) bumetanida e (c) monoclóridrato de metoclopramida. 34
- Figura 8** - Foto ilustrativa dos testes iniciais com os reagentes PABA, METO e BUMET, respectivamente. 35
- Figura 9** - Gráfico de absorvância versus comprimento de onda (nm) dos testes iniciais, utilizando o reagente (a) monoclóridrato de metoclopramida (METO), (b) Bumetanida (BUMET) e (c) ácido 4-aminobenzóico (PABA); b= 1 cm. 36

- Figura 10** - Gráfico de absorvância versus comprimento de onda (nm) dos testes do meio reacional; $b = 1$ cm. 37
- Figura 11** - Esquema da reação entre PABA e HMF. 38
- Figura 12** - Esquema da reação entre ácido barbitúrico e HMF. 38
- Figura 13** - Gráfico de absorvância versus comprimento de onda (nm) da reação entre $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de HMF e (a) ácido barbitúrico $1,0 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$, (b) PABA $6,0 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$, (c) ácido barbitúrico $1,0 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ e PABA $6,0 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$; $b = 1$ cm. 39
- Figura 14** - Gráfico de absorvância versus comprimento de onda (nm) relativo à estabilidade da reação em tempos distintos; $b = 1$ cm. 40
- Figura 15** - Gráficos de efeitos principais. Obs.: os valores da alça de reagente, amostra e bobina reacional estão em função do comprimento, os valores: 30 equivalem a $151 \text{ } \mu\text{L}$; 84 equivale a $422 \text{ } \mu\text{L}$; 85 equivale a $427 \text{ } \mu\text{L}$; 120 equivale a $603 \text{ } \mu\text{L}$ e 160 equivale a $804 \text{ } \mu\text{L}$. 43
- Figura 16** - Gráfico de Pareto. 43
- Figura 17** - Gráfico de absorvância versus volume da bobina reacional (μL) para os volumes 804, 904, 1005 e 1105 μL ; $b = 1$ cm. 44
- Figura 18** - Curva analítica do 5-hidroximetil-2-furfural, faixa linear de 0,5 a $40,0 \text{ mg L}^{-1}$, $\lambda = 390 \text{ nm}$ e $b = 1$ cm. 45
- Figura 19** - Diagrama do teste com amostra 2 (a) branco, (b) solução padrão $2,04 \pm 0,02 \text{ mg kg}^{-1}$, (c) solução da amostra fortificada, (d) solução da amostra pura. $\lambda = 390 \text{ nm}$ e $b = 1$ cm. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções das soluções de reagentes utilizadas nos testes do meio reacional.	37
Tabela 2 - Descrição dos fatores e suas codificações.	40
Tabela 3 - Tabela de ensaios mostrando os fatores codificados utilizados no planejamento experimental.	41
Tabela 4 - Resultados dos ensaios do planejamento experimental.	42
Tabela 5 - Porcentagem de repetibilidade intra-dia e inter-dia para o HMF.	46
Tabela 6 - Porcentagem de recuperação de 2,00 mg L ⁻¹ de HMF para o estudo com interferentes.	48
Tabela 7 - Resultados para o estudo de adição de padrão e recuperação do HMF em mel de laranjeira.	49
Tabela 8 - Resultados para o estudo de adição de padrão e recuperação do HMF em mel de eucalipto.	49
Tabela 9 - Amostras utilizadas no método desenvolvido.	50
Tabela 10 - Comparação entre os resultados obtidos no método desenvolvido e no método oficial.	51
Tabela 11 - Comparação entre os resultados obtidos no método desenvolvido e no método por CLAE.	52
Tabela 12 - Comparação dos consumos por análise.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-CMF – 5-clorometilfurfural

RSD – Desvio padrão relativo

AOAC – *Association of analytical communities*

BUME – bumetanida

b – Caminho ótico

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

DL₅₀ – Dose letal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FIA – Análise por injeção em fluxo

HMF – 5-hidroximetil-2-furfuraldeído

IHC – Comissão Internacional do Mel SMF – 5-sulfoximetilfurfural

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

METO – Monocloridrato de metoclopramida

NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida

PABA – ácido p-aminobenzóico

S1 – Solução 1

S2 – Solução 2

S3 – Solução 3

S4 – Solução 4

S5 – Solução 5

S6 – Solução 6

SD – Desvio padrão

SP – Solução padrão

\bar{x} – Média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O mel	15
1.1.1 5-Hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF)	18
1.1.2 Metodologias de análise do HMF em mel	21
1.2 Algumas considerações sobre análise por injeção em fluxo (FIA)	24
1.2.1 Química verde	26
2 OBJETIVO	28
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
3.1 Materiais e equipamentos	29
3.1.1 Materiais e equipamentos gerais	29
3.1.2 Sistema de análise por injeção em fluxo	29
3.2 Reagentes e Soluções	30
3.2.1 Reagentes	30
3.2.2 Soluções	30
3.2.2.1 Testes qualitativos	30
3.2.2.2 Estabilidade da reação	31
3.2.2.3 Planejamento experimental	32
3.2.2.4 Planejamento univariado	32
3.2.2.5 Curva analítica	32
3.2.2.6 Tratamento das amostras	32
3.2.2.6.1 Amostras sem tratamento de clarificação	32
3.2.2.6.2 Tratamento de clarificação das amostras	33
3.2.2.7 Adição de padrão e recuperação	33
3.2.2.8 Estudo de interferentes	33
3.2.2.9 Análise de amostras	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Testes qualitativos	34
4.2 Estabilidade do produto da reação	39
4.3 Planejamento experimental	40
4.4 Planejamento univariado	44
4.5 Curva analítica	45
4.6 Tratamento das amostras	46

4.7 Estudo de interferentes	48
4.8 Adição de padrão e recuperação	48
4.9 Análises de amostras	50
5 CONCLUSÃO	54
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de mel vem crescendo nos últimos anos (Figura 1), com isso a participação do Brasil no mercado internacional também aumentou. Com a alta demanda, as exigências também cresceram para manter a segurança e qualidade dos produtos derivados das abelhas (FEIJÓ et al., 2013).

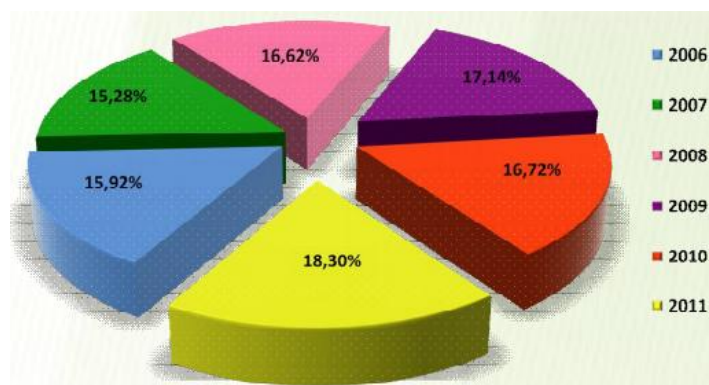


Figura 1 - Porcentagem da produção brasileira de mel de 2006 a 2011. [Fonte: FEIJÓ et al., 2013].

A crise do mel chinês em 2000 e extermínio das colmeias na Europa e Estados Unidos, apresentaram o Brasil como um possível produtor e exportador de mel. Entretanto, em 2006, o mercado Europeu embargou o produto brasileiro alegando uma carência no controle de resíduos aos moldes europeus. Em 2008 o embargo foi removido e as certificações brasileiras foram aceitas. Devido a essas crises e um investimento governamental na apicultura, em 2010, o Brasil alcançou o posto de 11º mais importante produtor mundial e o 5º maior exportador, isso se deve ao ótimo padrão de qualidade do mel e por ser um produto livre de defensivos agrícolas (RANGEL, 2011).

A apicultura vem crescendo no Brasil e com isso não pode negligenciar as análises físico-químicas necessárias para garantir a qualidade do mel, por isso é necessário um investimento em pesquisa e desenvolvimento dos métodos de análise referentes ao controle de qualidade do mel.

1.1 O mel

O mel é um produto gerado pelas abelhas *Apis mellifera* a partir do néctar das plantas, secreções das partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas sobre as partes vivas da mesma, os quais as abelhas coletam,

transformam com uma combinação de substâncias próprias, armazenando e deixando maturar nas colmeias (EUROPEAN UNION, 2002; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2000).

Uma das primeiras substâncias utilizadas para adoçar os alimentos foi o mel (FEÁS et al., 2010). Nas comunidades primitivas tanto as abelhas como o mel eram considerados sagrados. No princípio as colmeias eram coletadas nas florestas, porém esse hábito foi substituído pela apicultura, ou seja, o cultivo das colmeias, prática que perdura até hoje. Na época medieval a colmeia passou a ter um importante valor econômico. Inventários datados do século IX relatam que colmeias eram registradas como parte dos bens familiares. Porém em 1600, quando os primeiros cultivos de cana-de-açúcar começaram nas Índias ocidentais, o consumo de mel começou a ser substituído pelo de açúcar (CRANE, 1985).

Por ser um produto natural, de fácil digestão e com alto poder nutricional, o mel ainda hoje está presente na nutrição humana. O aumento no seu consumo pode ser atribuído a um maior interesse da população na busca de alimentos naturais benéficos à saúde. O mel também é considerado um alimento funcional (FEÁS et al., 2010), ou seja, é um alimento que além de apresentar as propriedades nutricionais básicas, apresenta a propriedade metabólica e fisiológica no crescimento, desenvolvimento e manutenção das funções normais do organismo humano (AGÊNCIA NACIONAL..., 1999).

Segundo Islam et al. (2014), algumas flores das quais o néctar é extraído, pode conter compostos tóxicos a saúde humana, apesar de não fazer mal as abelhas e suas larvas. A presença de metais pesados pode ser um indicativo de contaminação no ambiente, portanto o mel pode ser considerado um indicador de poluição ambiental.

Apesar de o mel possuir altas concentrações de açúcares e baixo pH, que sobre certas condições favorecem o crescimento de micro-organismos, ele possui componentes secundários e características que lhe conferem algumas propriedades medicinais; um exemplo é a presença de lisozima, enzima que apresenta atividade antimicrobiana. Outras propriedades medicinais presentes no mel são o efeito anti-inflamatório, propriedades antivirais, atividade anti-ulcera e antioxidante. Estudos recentes mostram o mel como um protetor alimentício, utilizado como substituinte alternativo do sulfito no controle do escurecimento enzimático, durante o

processamento de frutas e vegetais, para obtenção de sucos e conservas (VIUDA-MARTOS et al., 2008).

O mel é classificado como floral ou mel de melato. O mel floral ainda pode ser dividido em monofloral (origem de flores individuais) e polifloral (quando é originado de diversas flores). O mel monofloral apresenta uma melhor qualidade do produto por possuir aroma e sabor específico e característico da planta (FALLICO et al., 2004; MENDES et al., 2009). O mel de melato é aquele originado das secreções das partes vivas das plantas e exceções de animais sugadores (MENDES et al., 2009).

A cor do mel varia com a origem floral, assim como com a idade e a temperatura, outro fator que pode influenciar na cor do mel é a presença de metais. No mercado mundial méis mais claros alcançam preços melhores (MENDES et al., 2009).

O mel é um dos produtos naturais com a maior complexidade na mistura de seus carboidratos (ISLAM et al., 2014). Geralmente seus principais constituintes são açúcares, dos quais 70% são frutose e glicose; cerca de 10% são dissacarídeos, incluindo sacarose e maltose; e a água, nos quais os açúcares estão dissolvidos, que chega a cerca de 17-20% (CRANE, 1985). Apesar da composição do mel depender principalmente do vegetal o qual o mel procede, outros fatores podem influenciar como o solo, condições climáticas e regionais (CRANE, 1985; AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2010).

Méis podem ser adulterados a partir da introdução de xaropes como, por exemplo, o xarope de milho. A adulteração do mel pode trazer sérios riscos à saúde, ainda mais se consumidores diabéticos usarem tais méis sem saber da contaminação, devido à presença de altas concentrações de carboidratos. Na China e em outros países, méis adulterados são rotulados como mel puro e vendidos com o mesmo preço, o que é um ato ilegal com os consumidores (ISLAM et al., 2014). O *Codex Alimentarius* (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2000) descreve que nenhum composto incluindo aditivos alimentares pode ser adicionado ao mel, sendo a única mistura permitida aquelas entre os próprios méis.

Alguns compostos do mel podem indicar rapidamente essa adulteração, a um nível de 10 a 50% de adulterante como, por exemplo, o aumento da quantidade de cinzas, teor de umidade, cálcio e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF). Apesar de esses componentes serem um diferencial na adulteração, essa adulteração só pode

ser confirmada em comparação ao mel natural (ABDEL-AAL; ZIENA; YOUSSEF, 1993).

O HMF não pode ser usado exclusivamente como indicador de adulteração, devido a sua presença natural no mel, é difícil diferenciar a presença de HMF do mel natural em relação ao adulterado. (ABDEL-AAL; ZIENA; YOUSSEF, 1993; WHITE; SICILIANO, 1980). Muitos dos adulterantes apresentam baixas quantidades de HMF, como o xarope de milho rico em frutose e alguns dos xaropes de milho convencionais. Assim outros parâmetros são necessários para verificar tais adulterações (WHITE; SICILIANO, 1980).

1.1.1 5-Hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF)

O mel passa por um processo de aquecimento e filtração para retardar a granulação, eliminar os esporos de leveduras e aumentar seu tempo de prateleira. (WHITE; SICILIANO, 1980; ISLAM et al. 2014). Este processo de aquecimento ajuda a facilitar o processamento do mel e manter sua qualidade, porém as temperaturas altas no tratamento do mel podem levar a produção do HMF e diminuição da qualidade do mel (AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2010).

O 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (Figura 2), conhecido também como hidroximetilfurfural, 5-hidroximetilfurfural, 5-hidroximetil-2-furfural ou HMF, é um dos constituintes secundários do mel mais discutidos. Este é utilizado como fator de controle de qualidade, sua quantidade presente no mel é um indicador direto de qualidade (CRANE, 1985). Em méis frescos, o HMF é praticamente ausente, aumentando com a temperatura, armazenamento inadequado e adulteração do mel, como dito anteriormente (AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2010).

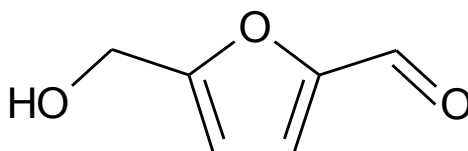


Figura 2 - Estrutura do 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF).

O HMF é formado nos alimentos pelo aquecimento de monossacarídeos sob condições ácidas. A reação começa lentamente com a enolização de carboidratos, formando intermediários importantes, seguida por consecutivas desidratações

(BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). A Figura 3 mostra a reação de formação do HMF.

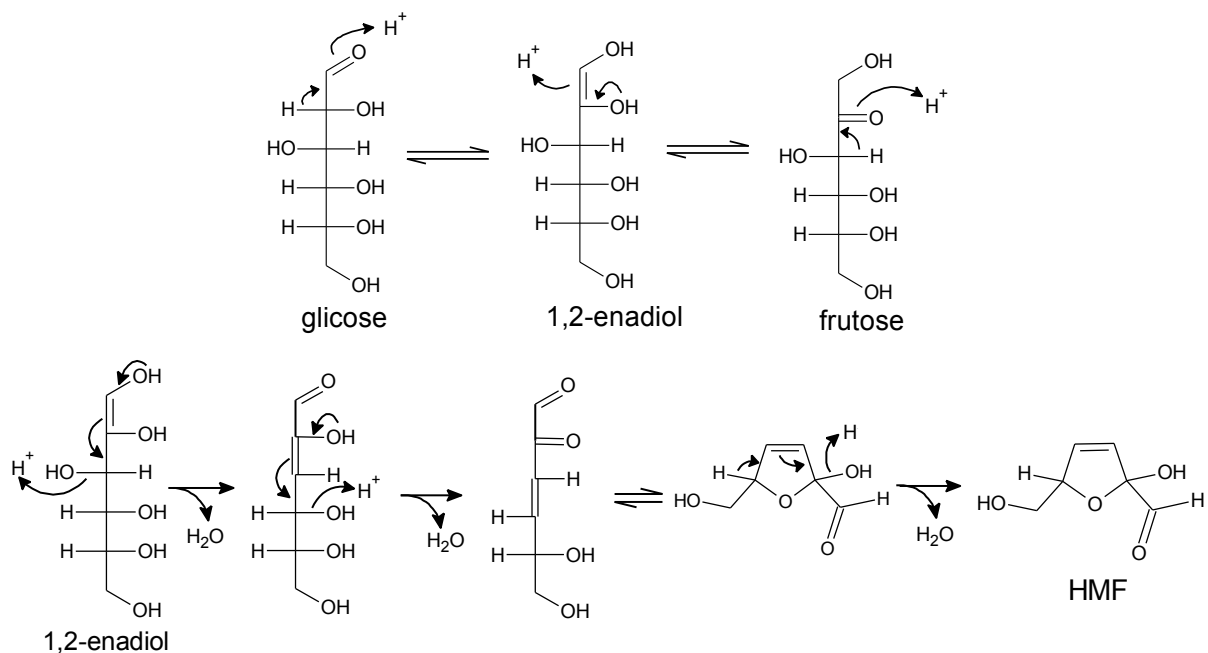


Figura 3 - Reação de formação do HMF por desidratação de açúcares em meio ácido, adaptado de Belitz, Grosch e Schieberle (2009, p. 264-265).

Além da temperatura e do tempo de aquecimento, outros compostos e propriedades do mel afetam a formação do HMF, como o tipo de açúcar, pH, a presença de minerais, ácidos orgânicos, a acidez total e baixa atividade da água. Entretanto ainda não existem estudos que comprovem a relação da composição química do mel e a produção do HMF (AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2010; CAPUANO; FOGLIANO, 2011; FALLICO et al., 2004).

Segundo Crane (1985) a cada 10°C extras, a velocidade de produção do HMF aumenta em 4,5 vezes, por exemplo, um mel que levaria cem dias para começar a produzir HMF a 30°C, levaria vinte dias para produzir a 40°C. Em regiões tropicais as colmeias já se encontram em temperaturas elevadas, nessas regiões o mel apresenta concentrações de HMF superiores ao permitido mesmo sem um aquecimento prévio.

Segundo os estudos de Fallico et al. (2004), no aquecimento do mel abaixo de 50°C, a temperatura não é o único fator que influencia na produção do HMF, o pH também exerce influência nessa produção. Acima dessa temperatura o tempo de aquecimento e a temperatura são os principais fatores que influenciam na produção.

Um fator importante que não pode ser negligenciado é a origem floral do mel. Em seus estudos Fallico et al. (2004) cita que o mel de castanha-portuguesa leva muito mais tempo para formar o HMF em relação ao mel de eucalipto e laranjeira, ou seja, esse é um fator importante a ser considerado. Estudos de Ajlouni e Sujirapinyokul (2010) corroboram com a ideia de Fallico et al. (2004); em seus estudos mostram que algumas floras já apresentam altas concentrações de HMF mesmo sem o tratamento térmico. Esses autores citam que as condições climáticas de regiões tropicais podem influenciar na produção do HMF no mel desde a colmeia.

Os fatores que levam a formação do HMF no mel ainda não são bem estabelecidos, porém a presença dessa substância e sua ingestão pode ser prejudicial à saúde humana. O HMF é descrito como uma substância citotóxica, mutagênica, genotóxica, carcinogênica, irritante aos olhos, sistema respiratório, pele e mucosas (CAPUANO; FOGLIANO, 2011).

Essa substância pode ser rapidamente metabolizada através da oxidação do HMF a ácido 5-hidroximetilfurfuroico que se conjuga com a glicina formando o N-5-hidroximetil-2-furoilo glicina, o qual é rapidamente excretado pela urina. Esta é a principal via metabólica do HMF no ser humano, porém o HMF apresenta outra via metabólica que produz o 5-sulfoximetilfurfural (SMF); este composto, por apresentar um grupo sulfóxido é extremamente reativo, podendo reagir com o DNA e outras macromoléculas do organismo, causando toxicidade e mutagenicidade (CAPUANO; FOGLIANO, 2011; ISLAM et al., 2014). Islam et al. (2014) cita que o HMF também pode ser metabolizado via cloração alílica, no estômago, devido à alta concentração de íons cloreto no suco gástrico, que induz a formação do 5-clorometilfurfural (5-CMF), sendo este considerado mais mutagênico que o SMF, porém segundo Capuano e Fogliano (2011) o 5-CMF nunca foi detectado *in vivo*.

Apesar da maioria dos estudos serem feitos em roedores, a exposição do ser humano ao HMF é muito maior devido a sua presença em uma vasta gama de gêneros alimentícios, o que pode levar a um risco maior a saúde humana (ISLAM et al., 2014). Apesar disso, não há dados conclusivos indicando se a ingestão de HMF realmente representa um risco à saúde humana. Ainda são necessários mais estudos com relação à quantidade máxima da exposição diária de HMF na alimentação humana, assim como um estudo em relação à presença deste composto em alimentos e estratégias para diminuir a sua presença em tais alimentos. A tarefa de remoção e diminuição do HMF nos alimentos é difícil já que a

sua via de formação é a mesma responsável pela produção do aroma e sabor em muitos alimentos (CAPUANO; FOGLIANO, 2011). Ainda assim, estratégias de abrandamento na produção de HMF durante a formulação, produção e pós-produção de alimentos estão sendo estudadas (ZIRBES et al., 2013).

Segundo Zibers e colaboradores (2013), o HMF também pode ser um responsável indireto pela mortalidade das abelhas. Muitos produtores na Europa e Estados Unidos alimentam as abelhas com xarope de milho durante o inverno, esses xaropes podem conter altas doses de HMF, o que pode levar a uma mortalidade direta ou indireta das abelhas.

1.1.2 Metodologias de análise do HMF em mel

Segundo o *Codex Alimentarius* e as diretrizes da União Europeia, a concentração máxima de HMF permitida é de 40 mg kg⁻¹ de mel, com exceção a méis de origem tropical e suas misturas, sendo que para estes a concentração máxima permitida é de 80 mg kg⁻¹ (EUROPEAN UNION, 2002; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2000). A legislação brasileira permite no máximo 60 mg kg⁻¹ (BRASIL, 2000, p. 16-17).

Segundo a Comissão Internacional do Mel (International Honey Commission–IHC) os principais métodos estabelecidos para a determinação de HMF são o método de Winkler, White e a determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BOGDANOV, 2009). A legislação brasileira, a da União Europeia e o *Codex Alimentarius* aceitam como método oficial o método 980.23 hidroximetilfurfural em mel da *association of analytical communities* (AOAC) (HORWITZ, 2005), também conhecido como método de White (WHITE, 1979), a União Europeia e o *Codex Alimentarius* aceitam também o método por CLAE descrito pelo IHC (BOGDANOV, 2009; EUROPEAN UNION, 2002; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2000).

O método de Winkler utiliza como reagentes cromogênicos o ácido barbitúrico e a p-toluidina. A reação desses compostos com o HMF gera um produto colorido analisado por espectrofotometria; a medida da intensidade da cor resultante é feita em 550 nm (BOGDANOV, 2009). As quantidades de reagente utilizados no método de Winkler são elevadas, 10 g de p-toluidina para 100 mL de solução e 500 mg de ácido barbitúrico para 100 mL de solução (BOGDANOV, 2009). Essas soluções são

preparadas separadamente, assim temos reagentes concentrados e grandes volumes de soluções, conseqüentemente o volume de resíduo é elevado. O reagente p-toluidina, utilizado neste método, tem alto potencial carcinogênico, causa irritação aos olhos e pele, náusea, vômito, anemia entre outros danos a saúde (O'NEIL, 2006, p. 9536), sua dose letal (DL₅₀) para ratazanas é de 336 mg kg⁻¹ (p-TOLUIDINA, 2013), apresentando assim risco à saúde do analista e ao ambiente.

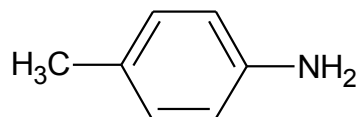


Figura 4 - Estrutura p-toluidina.

No método de White, o reagente cromogênico utilizado é o bissulfito de sódio. A medida espectrofotométrica é realizada na região do ultravioleta (UV), em 284 nm, (BOGDANOV, 2009; HORWITZ, 2005; WHITE, 1979). Este composto é tóxico e possui DL₅₀ de 115 mg kg⁻¹ para ratazanas (O'NEIL, 2006, p. 8588). Na região de 284 nm há alguns compostos do mel que interferem na análise do HMF. Para corrigir essa interferência, realiza-se uma medida de absorvância em 336 nm; subtrai-se o valor da absorvância obtido em 336 nm (A_{336}) do valor obtido em 284 nm (A_{284}), como mostra a equação (1), a fim de se obter a concentração do HMF (BOGDANOV, 2009). Segundo Wunderlin et al. (1998), o método falha ao detectar o HMF em baixas concentrações, como no caso do mel que apresenta baixa atividade diastica.

$$\frac{\text{mg HMF}}{100 \text{ g}} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 14,97 \times 5}{\text{g amostra}} \quad \text{equação (1)}$$

O valor 14,97 é uma constante baseada na massa molar e absortividade molar do HMF e 5 representa a massa teórica do mel (BOGDANOV, 2009; HORWITZ, 2005; WHITE, 1979).

A análise por CLAE não utiliza reagentes tóxicos para a derivatização do HMF, pois está não é necessária, porém utiliza-se metanol na fase móvel (BOGDANOV, 2009). O metanol é um composto tóxico que causa irritação aos olhos, pele e sistema respiratório, causa também dores de cabeça, vertigem, vômito, distúrbios visuais, danos ao nervo ótico entre outros problemas sérios (O'NEIL,

2006, p. 5957), sendo o seu uso uma desvantagem para a saúde do analista. Também pode ser absorvido pela pele e por inalação, apresenta solubilidade em água e absorção semelhante a da água no organismo. O metanol apresenta toxicidade relativamente baixa perante seus produtos metabólicos, sendo um deles o formaldeído e subseqüentemente ácido fórmico que é um composto também de alta toxicidade (BARCELOUX et al., 2002).

Existem ainda controvérsias em relação ao preparo de amostra de mel para a análise de HMF por CLAE, na descrição da metodologia segundo o IHC as amostras de mel não precisam de tratamento prévio para a injeção no equipamento, apenas a realização de uma filtração prévia em filtro 0,45 μm . Para este tipo de preparo de amostra recomenda-se que a análise seja realizada até 30 minutos depois do preparo da amostra (BOGDANOV, 2009). Segundo estudos de Käzig, Kaufmann e Bogdanov (2001), com o passar do tempo, o HMF presente na solução de mel decai drasticamente, devido a uma possível degradação do HMF em solução causado por algum constituinte do mel. Assim o preparo da amostra deve ser o mesmo descrito no método 980.23 hidroximetilfurfural em mel descrito pela AOAC (HORWITZ, 2005). Essa metodologia utiliza dois sais para remover a coloração do mel, chamados de solução de Carrez I [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] e Carrez II [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] (WHITE; 1979). Segundo Käzig, Kaufmann e Bogdanov (2001) essas soluções de Carrez I e II precipitam o constituinte responsável pela degradação do HMF, inibindo sua degradação.

Os métodos espectrofotométricos de Winkler e White são menos sensíveis que a determinação por CLAE. O método de White e CLAE apresentam resultados comparáveis, mas normalmente eles são menores que os resultados obtidos pelo método de Winkler. Entretanto os três métodos apresentam resultados que não diferem entre si significativamente, na faixa de trabalho entre 20 e 40 mg kg^{-1} (BOGDANOV, 2009).

Outras metodologias de análise de HMF em mel são descritas na literatura. Um exemplo são os biossensores eletroquímicos desenvolvidos por Lomillo, Campo e Pascual (2006), são biossensores baseados na enzima aldeído desidrogenase acoplada com a enzima NADH oxidase e com a enzima diaforase. A vantagem dessa técnica é sua especificidade, porém existem problemas associados à interferência de outros compostos eletroativos no meio.

Os pesquisadores Kim e Richardson (1992) desenvolveram um método para determinação de HMF em mel e outros alimentos utilizando a cromatografia por exclusão iônica com detector de arranjo de fotodiodo. Em seus estudos esses autores relatam que essa metodologia é mais eficiente em relação à metodologia por CLAE descrita pelo IHC (BOGDANOV, 2009) devido à diminuição dos interferentes na análise (KIM; RICHARDSON, 1992).

O grupo de Salinas, Espinosa-Mansilla e Nevado (1991) e o grupo de Iglesia et al. (1997) desenvolveram métodos para análise de HMF em alimentos utilizando a análise por injeção em fluxo baseado no método de Winkler, porém estes métodos utilizam os mesmos reagentes que a metodologia original, assim como utilizam a mesma concentração da p-toluidina (10% m/v) (BOGDANOV, 2000), como foi dito anteriormente a p-toluidina é um reagente de alta toxicidade (O'NEIL, 2006).

Outra metodologia de análise por injeção em fluxo foi desenvolvida, porém utilizando a técnica de “stopped-flow”, baseando-se na reação do HMF com o ácido tiobarbitúrico, a desvantagem deste método é a utilização de aquecimento para o desenvolvimento da reação (ESPINOSA-MANSILLA; PEÑA; SALINAS, 1993).

Devido ao número reduzido de trabalhos utilizando procedimentos por injeção em fluxo para análise de HMF em mel e a utilização de compostos tóxicos em tais trabalhos verifica-se a necessidade de desenvolvimento de métodos de análise por injeção em fluxo que atenda a filosofia da Química Verde.

1.2 Algumas considerações sobre análise por injeção em fluxo (FIA)

A análise por injeção em fluxo (flow injection analysis – FIA) baseia-se na injeção de uma amostra por um fluxo transportador não segmentado, utilizando um fluido carregador compatível com a amostra. A amostra injetada forma zonas, as quais são transportadas até um detector que registra continuamente um parâmetro físico; esse parâmetro muda continuamente com a passagem da amostra pela célula de fluxo. Importante visar que toda amostra é processada sequencialmente da mesma maneira durante a passagem pelo caminho analítico, ou seja, o que acontece com uma amostra acontece igualmente com todas as outras (RŮŽIČKA; HANSEN, 1988).

O sistema FIA mais simples (Figura 5(a)) consiste em: uma bomba responsável por impulsionar as soluções pelos tubos; um injetor, a qual um volume

definido da solução da amostra é injetado no sistema sempre da mesma forma; um reator ou bobina reacional, o qual dispersa a zona da amostra e mistura a amostra ao reagente, formando uma espécie que será registrada no detector. O registro se dá na forma de um pico, onde a área ou a altura é proporcional à concentração do analito (RŮŽIČKA; HANSEN, 1988).

Existem diferentes sistemas FIA, o sistema de fluxo por zonas coalescentes (Figura 5(b)) foi o primeiro sistema que buscou economizar reagentes e amostra (RŮŽIČKA; HANSEN, 1988). Neste sistema a amostra e o reagente são adicionados por caminhos independentes até um ponto de mistura onde as soluções se misturam e a reação acontece (ROCHA; NÓBREGA; FATIBELLO FILHO, 2001). A otimização e o design do fluxo permitem uma economia ainda maior de amostra e reagente e uma melhor frequência de amostragem (RŮŽIČKA; HANSEN, 1988).

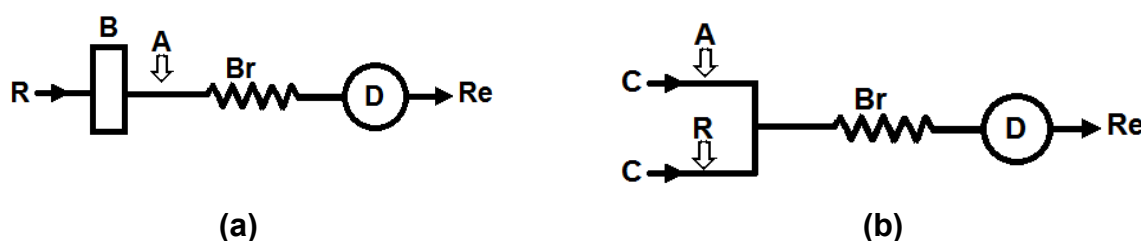


Figura 5 - Esquema dos sistemas em fluxo. (a) sistema simples; (b) zonas coalescentes. R: reagente; A: amostra; B: bomba peristáltica; Re: resíduo; Br: bobina de reação; D: detector e C: fluido carregador. [Fonte: adaptado de Rocha, Nóbrega e Fatibello Filho (2001) e Růžička e Hansen (1988)].

As técnicas de análise em fluxo são muito utilizadas em laboratórios de rotina e pesquisa. O desenvolvimento dessa técnica permitiu aumentar o número de análises e a rapidez com que eram feitas, além de diminuir a interferência do analista (ROCHA; NÓBREGA; FATIBELLO FILHO, 2001). Ao mesmo tempo, a versatilidade do sistema FIA permite adaptá-lo a diferentes detectores e técnicas usando diversas configurações, o que permite inúmeras aplicações (RŮŽIČKA; HANSEN, 1988).

O sistema em fluxo também pode ser aplicado no preparo de amostras, através da diluição ou pré-concentração dos analitos; executar a separação baseados na extração por solventes, troca iônica, difusão gasosa e diálise; preparar reagentes instáveis *in situ* e também diluir o reagente para a concentração desejada na análise (RŮŽIČKA; HANSEN, 1988).

O uso dos procedimentos de análise por injeção em fluxo (FIA) tem como vantagens intrínsecas a rapidez, simplicidade, baixo custo e versatilidade, além de estar de acordo com os princípios da Química Verde em razão de minimizar o uso de reagentes e produção de resíduos na maioria dos casos. Outra vantagem do uso dos procedimentos em fluxo é a disponibilidade de tratar os resíduos no sistema, através da introdução, após a célula de fluxo, de reagentes que possam destruir ou passivar o resíduo tóxico da análise (ROCHA; NÓBREGA; FATIBELLO FILHO, 2001; SUAREZ; VIEIRA; FATIBELLO FILHO, 2004). A ação combinada da minimização do consumo de reagentes e tratamento de resíduos torna a FIA um processo analítico viável para o desenvolvimento de métodos que seguem a filosofia da Química Verde (NÓBREGA; FATIBELLO FILHO, 2001).

1.2.1 Química verde

Muitas vezes os métodos empregados utilizam reagentes mais tóxicos do que as substâncias analisadas no ambiente. Hoje, busca-se o desenvolvimento de métodos analíticos que sejam menos prejudiciais aos seres humanos e ao ambiente (ROCHA; NÓBREGA; FATIBELLO FILHO, 2001). A Química Verde surgiu por volta dos anos 90 com a filosofia: “a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente” (ANASTAS; EGHBALI, 2010; CORRÊA; ZUIN, 2009).

A química verde surgiu não para controlar a poluição, ela é uma alternativa para aumentar a segurança, desempenho e eficiência de produtos e processos, visando também à redução ou eliminação das propriedades físico-químicas das substâncias, a um nível molecular, que caracterizam perigo a saúde humana e ao ambiente. A Química Verde se mostra uma ferramenta poderosa na busca da sustentabilidade e na busca de associar prosperidade econômica à responsabilidade social e ambiental (CORRÊA; ZUIN, 2009). Devido a essa característica ela vem sendo aplicada em vários setores da indústria como a aeroespacial, automobilística, farmacêutica e de eletrônicos, esses são exemplos bem sucedidos das aplicações da Química Verde. Isso se deve ao fato de a Química Verde não ter se atentado somente a laboratórios de pesquisa, mas também se expandiu para a indústria, educação e o público em geral (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Uma metodologia verde ideal seria aquele onde não são empregados reagentes, porém essa é uma meta difícil; de um modo mais realista, o ideal seria a utilização de reagentes não tóxicos. A tarefa de substituição de um reagente por um menos tóxico não é uma das mais fáceis, quando não é possível utilizar um reagente menos tóxico a quantidade do mesmo deve ser reduzida (ROCHA; NÓBREGA; FATIBELLO FILHO, 2001).

A vantagem da redução da quantidade de reagentes é diminuir os custos operacionais como os gastos com o tratamento e disposição dos resíduos (ROCHA; NÓBREGA; FATIBELLO FILHO, 2001). O conhecimento dos dados disponíveis sobre os compostos, bem como o seu ciclo de vida, e o mecanismo de ação o qual o composto pode levar a um risco a saúde humana e ao ambiente, ajuda os químicos a escolherem compostos mais favoráveis para projetar produtos e processos mais seguros (ANASTAS; WARNER, 2000).

Apesar de um processo muitas vezes não ser benigno por completo é importante que se desenvolva opções ou partes do processo mais verdes, para que se possa começar uma nova investigação nas partes onde não foi aplicada a Química Verde. A Química Verde não consegue resolver todos os problemas de uma vez só, porém todos os avanços feitos são importantes (ANASTAS, 1999).

O futuro da Química Verde é muito amplo como o próprio futuro da química, porém é difícil prever. A Química Verde estará sempre em um processo contínuo de melhoria, desenvolvimento e inovação em busca de uma química cada vez mais ambientalmente amigável (ANASTAS; WARNER, 2000). Neste sentido o uso da Química Verde na química analítica está se mostrando muito viável, a aplicação dos conceitos da Química Verde no desenvolvimento de novas metodologias de análises, a fim de reduzir o seu impacto ambiental, é um dos novos objetivos que se tem na química analítica (ANASTAS, 1999).

2 OBJETIVO

O objetivo do seguinte projeto é desenvolver um método de acordo com a filosofia da Química Verde, substituindo o composto carcinogênico p-toluidina por um menos tóxico e eficiente na determinação do 5-hidroximetil-2-furfuraldeído em mel, além da aplicação de um sistema semi-automatizado para agilizar as análises.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e equipamentos

3.1.1 Materiais e equipamentos gerais

No preparo das soluções foram utilizados: micropipetas (Eppendorf) de 10-100 μL , 100-1000 μL e de 500-5000 μL para medida os volumes; balança analítica Mettler Toledo AG204; vidrarias de uso geral como pipetas volumétricas, béqueres, balões volumétricos de diversos volumes e funis de vidro. Para o preparo do reagente foi utilizado banho termoeestático Marconi Mini MA126.

Os ensaios preliminares qualitativos e os ensaios da metodologia oficial foram realizados no espectrofotômetro com arranjo de fotodiodo HP 8453 com cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

O sistema cromatográfico utilizado foi o CLAE da SHIMADZU proeminence – 20AT, com detecção de arranjo de diodos (DAD). A coluna utilizada foi uma coluna cromatográfica OMNISPHER 5 C18 250 mm x 4,6 mm da Varian.

3.1.2 Sistema de análise por injeção em fluxo

As determinações foram realizadas por análise de injeção em fluxo (FIA) com zonas coalescentes (Figura 5). O sistema FIA constituiu-se por uma bomba peristáltica GILSON Modelo MINIPULS 3 de 8 canais. O sistema continha tubos de silicone (tygon) de 1,02 mm de diâmetro para a aspiração do fluído carregador, reagente e amostra; tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno; confluência de acrílico em “y” e uma válvula introdutora (comutador) em acrílico.

O detector utilizado foi o espectrofotômetro de fotodiodo HP 8453, modo cinético. A cubeta de fluxo utilizada era de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico e 160 μL de volume.

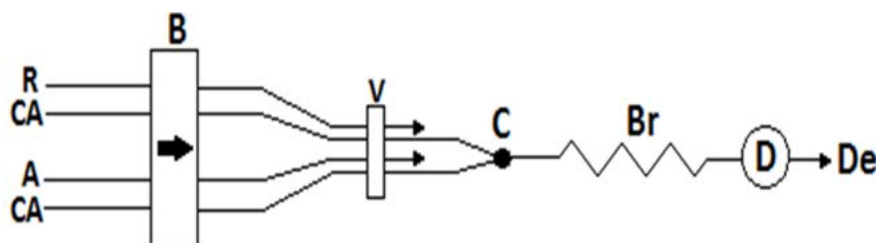


Figura 6 - Esquema do sistema de análise em fluxo com zonas coalescentes. R: reagente ([PABA]=6000 mg L⁻¹, [Ácido barbitúrico]=1000 mg L⁻¹ e volume=603 μL); CA: fluido carregador ([HCl]=0,08 mol L⁻¹); A: amostra (volume=427 μL); B: bomba peristáltica (Vazão=1,9 mL min⁻¹); V: válvula introdutora; De: descarte; C: confluência; Br: bobina de reação (volume=1005 μL) e D: detector. (Fonte: o autor).

3.2 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico. As soluções utilizadas foram preparadas com água deionizada, obtida no Deionizador Millipore Milli-Q plus (coluna Millipore 0,22 μm, condutividade 18,2 MΩ cm e temperatura 25° C). As soluções ácidas foram padronizadas conforme a literatura (SKOOG; WEST; HOLLER, 2007, p. 407-409).

3.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram: ácido 4-aminobenzóico (Henriframa); bumetanida (DEG importação de produtos químicos LTDA); monoclórato de metoclopramida (Purifarma); 5-hidroximetil-2-furfural (SIGMA-ALDRICH – pureza: 99%); ácido barbitúrico (MERCK); dodecil sulfato de sódio (SIGMA-ALDRICH – pureza: 98,5%); ácido clorídrico fumegante (MERCK – pureza: 37% m/m p.a.); ferrocianeto de potássio trihidratado (MALLINCKRODT CHEMICALS – pureza: 98,5%); acetato de zinco dihidratado (MALLINCKRODT CHEMICALS – pureza: 98%) e metanol (J. T. Baker – grau CLAE).

3.2.2 Soluções

3.2.2.1 Testes qualitativos

Modo de preparo das soluções dos testes iniciais:

- solução de bumetanida: foi preparada uma solução com concentração $6,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ em meio de metanol;

- solução de monoclórato de metoclopramida: foi preparada uma solução aquosa com concentração $6,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$;

- solução de ácido 4-aminobenzóico (PABA): foi preparada uma solução de PABA em meio de ácido clorídrico (HCl), com concentração $6,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,02 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de HMF foi preparada na concentração $40,00 \text{ mg L}^{-1}$.

O segundo teste realizado foi o teste do meio reacional. As soluções utilizadas estão descritas abaixo:

- solução 1 (S1): foi preparado uma solução contendo PABA e dodecilsulfato de sódio (SDS) nas concentrações $5,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

- solução 2 (S2): foi preparada uma solução de PABA com concentração $5,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$.

- solução 3 (S3): foi preparado uma solução ácida contendo PABA e SDS nas concentrações $5,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O reagentes foram solubilizados em meio de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

- solução 4 (S4): foi preparada uma solução de SDS com concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

- solução 5 (S5): foi preparada uma solução aquosa de ácido barbitúrico com concentração $5,00 \times 10^2 \text{ mg L}^{-1}$.

- solução 6 (S6): foi preparada uma solução de ácido clorídrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução padrão (SP) de HMF foi preparada em meio aquoso com concentração $50,00 \text{ mg L}^{-1}$.

3.2.2.2 Estabilidade da reação

A solução foi preparada na concentração $6,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ de PABA e $1,00 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido barbitúrico. O padrão foi preparado na concentração de $40,00 \text{ mg L}^{-1}$. A reação foi realizada a proporção 3:1 de reagente em relação ao padrão, foram feitas medidas de absorvância nos tempos 10, 30 60, 90, 120, 180, 240 e 300 segundos.

3.2.2.3 Planejamento experimental

As soluções de reagente utilizadas no planejamento experimental foram preparadas a partir da dissolução de ácido barbitúrico e PABA, em um mesmo balão volumétrico, a solução foi deixada por 20 minutos em um banho termostático a temperatura de 50,0° C, a fim de solubilizar completamente os reagentes.

A solução de HMF na concentração 50,00 mg L⁻¹ foi preparada no dia da análise. O fluido carregador foi preparado nas concentrações 0,08 mol L⁻¹ e 0,01 mol L⁻¹ de HCl.

3.2.2.4 Planejamento univariado

A solução reagente de ácido barbitúrico utilizada no planejamento univariado foi preparada nas concentrações 6,00x10³ mg L⁻¹ de PABA e 1,00x10³ mg L⁻¹. O fluido carregador utilizado foi HCl 0,08 mol L⁻¹. A solução de HMF foi preparada na concentração de 15,00 mg L⁻¹. As bobinas reacionais utilizadas no planejamento univariado apresentavam os volumes de 804, 904, 1005 e 1105 µL.

3.2.2.5 Curva analítica

As soluções de reagentes utilizadas na curva analítica foram preparadas nas concentrações 6,00x10³ mg L⁻¹ de PABA e 1,00x10³ mg L⁻¹ de ácido barbitúrico. O fluido carregador de HCl foi preparado na concentração 0,08 mol L⁻¹. A solução estoque de HMF foi preparada na concentração de 3,00x10² mg L⁻¹, a partir dessa solução foram preparadas soluções nas seguintes concentrações (em mg L⁻¹): 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 10,00; 15,00; 20,00; 25,00; 30,00; 35,00 e 40,00.

3.2.2.6 Tratamento das amostras

3.2.2.6.1 Amostras sem tratamento de clarificação

Duas amostras de mel sem tratamento foram preparadas pela dissolução de 2,5000 g de mel em 50,00 mL de solução. Uma das amostras foi fortificada na concentração de 2,00 mg L⁻¹ de HMF.

3.2.2.6.2 Tratamento de clarificação das amostras

O clareamento da amostra foi baseado na metodologia descrita na AOAC. Preparou-se a solução de mel pela dissolução de 2,5000 g de mel em 25,00 mL de água deionizada, em seguida foram adicionados 500 µL da solução de Carrez I, misturou-se a solução, em seguida adiciona-se 500 µL da solução de Carrez II, mistura-se e completou-se o volume da solução com água deionizada em um balão volumétrico de 50,00 mL. A solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo e os 10,0 mL iniciais foram descartados. As soluções de clarificação chamadas solução de Carrez I e II foram preparadas da seguinte forma:

- Carrez I: 3,7500 g de ferrocianeto de potássio triidratado foram dissolvidos em água deionizada, em um balão volumétrico de 25,00 mL.

- Carrez II: 7,5000 g de acetato de zinco diidratado foram dissolvidos em água deionizada, em um balão volumétrico de 25,00 mL.

3.2.2.7 Adição de padrão e recuperação

O teste de adição e recuperação foi realizado nas concentrações 50, 100, 150, 200, 250 e 300% da concentração inicial. A amostra de mel inicial foi fortificada para uma concentração final de 2,00 mg L⁻¹ de HMF.

3.2.2.8 Estudo de interferentes

O teste de interferentes foi realizado utilizando 2,00 mg L⁻¹ de HMF e as proporções 1:1 e 1:10 de interferente. Os interferentes testados foram glicose, frutose e sacarose.

3.2.2.9 Análise de amostras

As amostras foram analisadas pela metodologia desenvolvida, pelo método espectrofotométrico descrito no Método Oficial 980.23 hidroximetilfurfural em mel da AOAC (HORWITZ, 2005) e pelo método 5.1 determinação de hidroximetilfurfural por CLAE descrito nos métodos harmonizados da comissão internacional do mel (BOGDANOV, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes qualitativos

Algumas substâncias foram submetidas a testes iniciais para verificar os comportamentos como substituintes do composto p-toluidina, são elas o ácido 4-aminobenzóico (PABA), a bumetanida (BUME) e o monoclóridato de metoclopramida (METO). Essas três substâncias são fármacos, os quais apresentam grupos amino (NH_2) em sua estrutura molecular (Figura 7), esperava-se que esses grupamentos reagissem com o analito HMF da mesma forma que ocorre com o reagente p-toluidina.

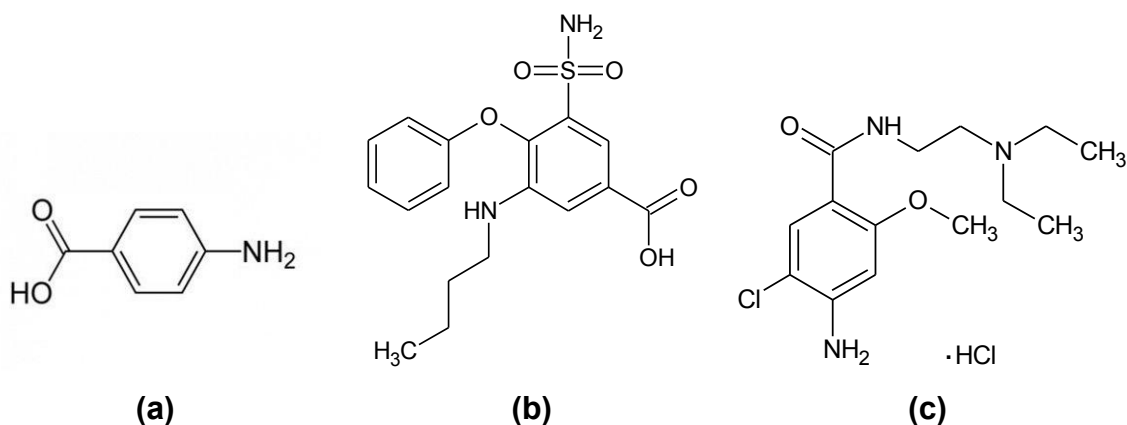


Figura 7 - Estrutura dos compostos testados para substituir a p-toluidina (a) PABA (b) bumetanida e (c) monoclóridato de metoclopramida.

A Figura 8 mostra um teste qualitativo, meramente ilustrativo, onde foram colocadas pequenas quantidades de reagente em 5 mL de água ou metanol, e adicionou-se o analito em altas concentrações, a fim de observar se a reação ocorria ou não em concentrações supersaturadas de analito e reagente.

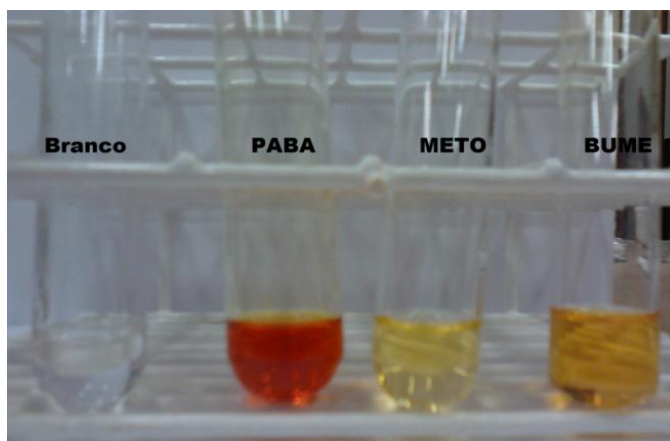


Figura 8 - Foto ilustrativa dos testes iniciais com os reagentes PABA, METO e BUME, respectivamente.

Foram obtidos os espectros dos brancos e da reação entre os reagentes e o HMF (Figura 9), utilizando concentrações conhecidas dos reagentes e do analito de interesse. Pelos espectros pode-se observar que apenas um dos reagentes apresentou uma banda referente à reação com o analito, este composto foi o PABA. O monoclóridato de metoclopramida, quando utilizado em pequenas concentrações, não reage com o HMF. A bumetanida apresentou um deslocamento da linha base em relação ao branco, este deslocamento pode ter sido causado por uma turvação não perceptível aos olhos.

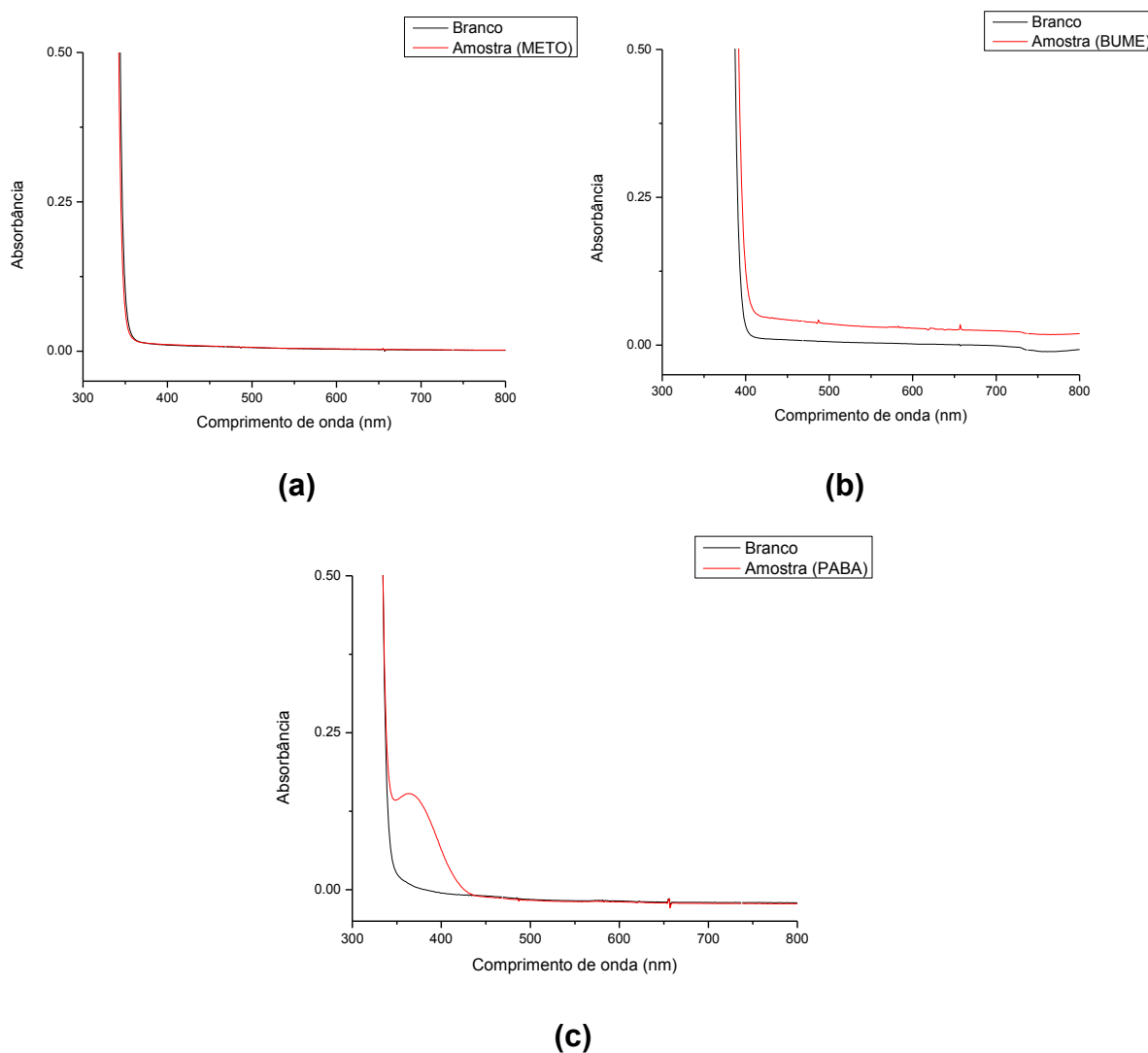


Figura 9 - Gráfico de absorvância versus comprimento de onda (nm) dos testes iniciais, utilizando o reagente (a) monoclóridrato de metoclopramida (METO), (b) Bumetanida (BUME) e (c) ácido 4-aminobenzóico (PABA); $b = 1$ cm.

A partir deste teste inicial realizaram-se alguns testes para determinar a influência de ácido clorídrico e dodecil sulfato de sódio no meio reacional quando se usa como reagente cromogênico ácido barbitúrico e o PABA como substituto da p-toluidina. A escolha de utilizar o meio ácido foi baseado nos estudos de Espinosa-Mansilla, Peña e Salinas (1993) que diz que a reação é influenciada pela concentração de H^+ . O surfactante foi utilizado na tentativa de melhorar a sensibilidade e a seletividade do método, através da formação de um ambiente micelar. A Tabela 1 mostra as proporções das soluções utilizadas no teste do meio reacional.

Tabela 1 - Proporções das soluções de reagentes utilizadas nos testes do meio reacional.

Teste	Proporções das soluções
Teste 1	6:1:2 (S2:S5:SP)
Teste 2	6:1:2 (S1:S5:SP)
Teste 3	11:2:1:4 (S2:S5:S6:SP)
Teste 4	11:2:1:4 (S1:S5:S6:SP)
Teste 5	11:1:2:4 (S2:S4:S5:SP)
Teste 6	6:1:2 (S3:S5:SP)

OBS.: as composições das soluções descritas na Tabela 1 estão relatadas no item 3.2.2.1 Teste qualitativo do procedimento experimental. As proporções das soluções seguem a ordem entre parênteses.

No teste 6, após alguns segundos, ocorreu a formação de um precipitado, não sendo possível a realização do seu espectro. Segundo os espectros dos testes do meio reacional, Figura 10, observa-se que o dodecil sulfato de sódio não exerce influência significativa na reação. Observa-se que a presença de HCl no teste 3 exerceu pequena influência sobre a reação em comparação aos outros testes, assim o ácido foi escolhido como fluido carregador. O HCl não foi utilizado no preparo da solução de PABA e ácido barbitúrico pois ele influencia no pH do meio tornando os reagentes insolúveis. Baseado nesses testes o comprimento de onda selecionado foi 390 nm, onde se encontra o máximo das absorvâncias.

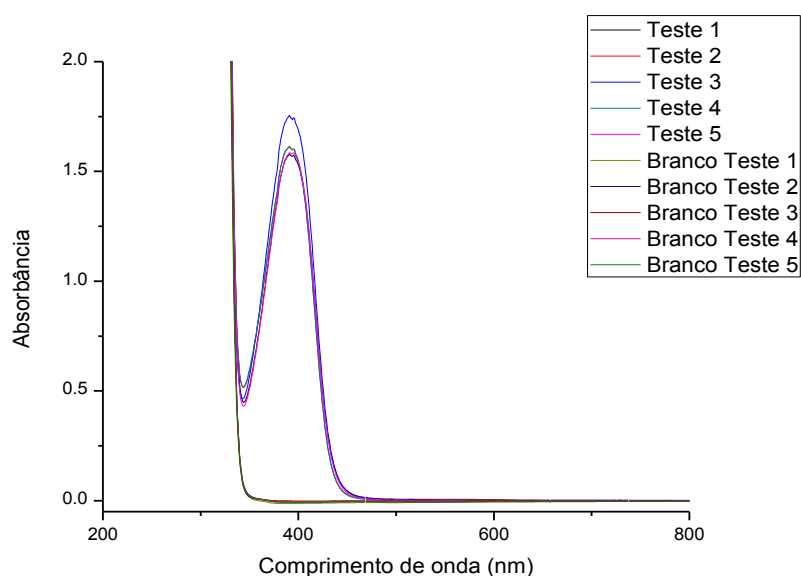


Figura 10 - Gráfico de absorvância versus comprimento de onda (nm) dos testes do meio reacional;
b= 1 cm.

Segundo o Merck Index (O'NEIL, 2006, p. 422), o PABA apresenta baixa toxicidade, a DL_{50} em ratos é maior que 6000 mg kg^{-1} , seu uso é vantajoso em relação a p-toluidina a qual é uma substância carcinogênica.

Baseado na reação entre a anilina e o furfural em meio ácido, proposto por Foley, Sanford e McKennis (1952), poderia-se supor uma hipótese para a reação entre o PABA e o HMF (Figura 11).

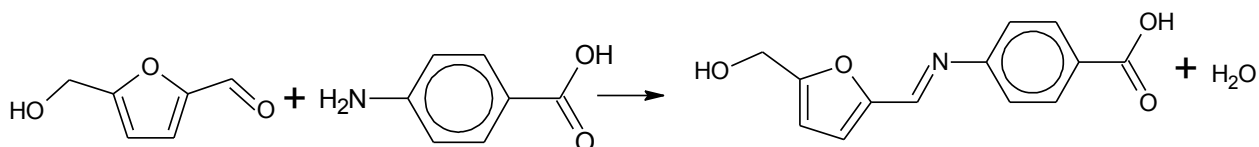


Figura 11 - Esquema da reação entre PABA e HMF.

Porém, Espinosa-Mansilla, Peña e Salinas (1993) descrevem em seu trabalho que a reação colorida ocorre entre o ácido tiobarbitúrico e o HMF. Com base nesse trabalho descrito na literatura, por analogia, poder-se-ia supor a hipótese que no presente caso a reação também ocorre entre o ácido barbitúrico e o HMF, apresentada na Figura 12.

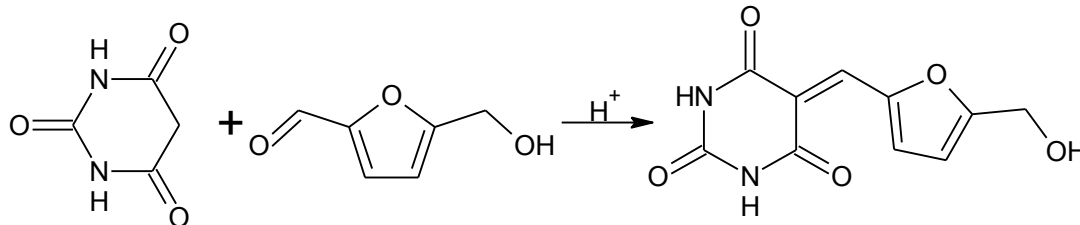


Figura 12 - Esquema da reação entre ácido barbitúrico e HMF.

Testes preliminares foram realizados para verificar se alguma das reações citadas acima era a responsável pela coloração observada na reação. A Figura 13 mostra que quando a reação é realizada na presença de apenas um dos reagentes, a reação apresenta valores de absorvância relativamente baixos comparados a absorvância da reação na qual ambos os reagentes estão presentes. Isso mostra que a reação segue uma rota envolvendo os dois reagentes em conjunto e não apenas uma somatória na absorvância das reações separadas. Pela espectro das reações pode-se observar que a presença de ambos os reagentes intensifica muito a absorvância em relação as absorvâncias dos compostos separados. Assim mais estudos seriam necessários para elucidar a reação de formação do composto colorido responsável pela absorção, o que foge do objetivo do presente trabalho.

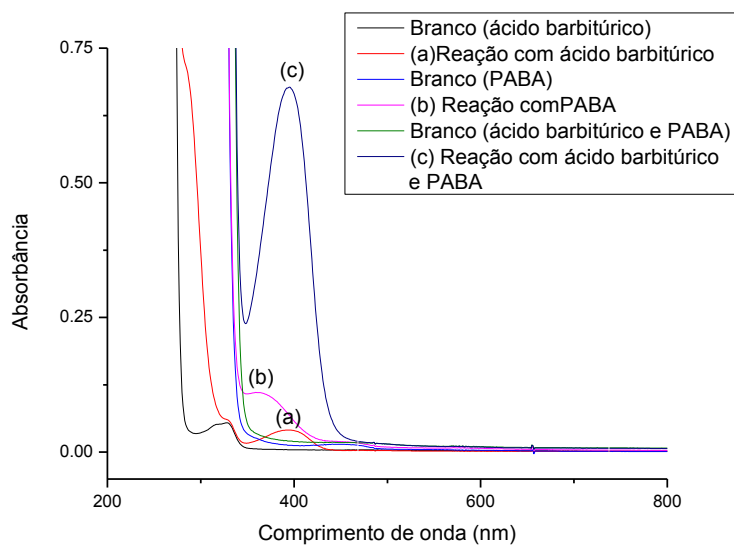


Figura 13 - Gráfico de absorvância versus comprimento de onda (nm) da reação entre 20,0 mg L⁻¹ de HMF e (a) ácido barbitúrico 1,0x10³ mg L⁻¹, (b) PABA 6,0x10³ mg L⁻¹, (c) ácido barbitúrico 1,0x10³ mg L⁻¹ e PABA 6,0x10³ mg L⁻¹; b= 1 cm.

4.2 Estabilidade do produto da reação

O estudo da estabilidade do produto da reação foi realizado para verificar o aumento da absorvância no decorrer da reação (Figura 14). Observa-se que a partir de 60 segundos a reação atinge seu máximo de absorvância e permanece estável no decorrer do tempo. A determinação do tempo de reação no sistema de análise por injeção em fluxo será determinado pelo volume da bobina reacional, quanto maior o seu volume utilizado na bobina reacional, maior será seu comprimento e maior será o tempo que a solução que estará reagindo levará para percorrer até atingir o detector.

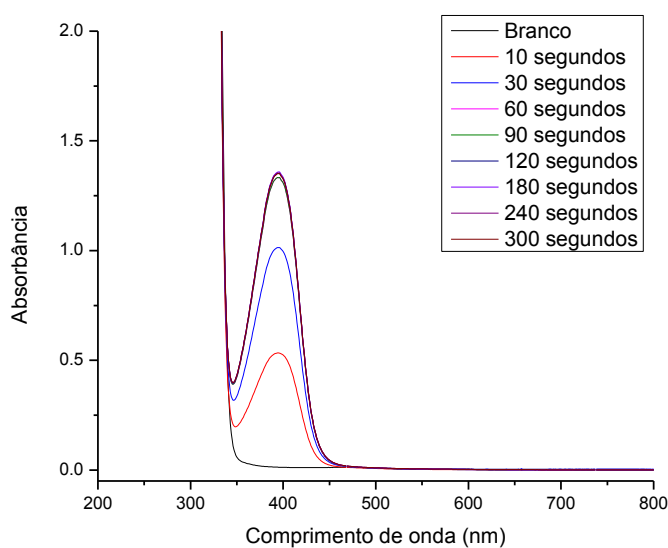


Figura 14 - Gráfico de absorvância versus comprimento de onda (nm) relativo à estabilidade da reação em tempos distintos; $b = 1$ cm.

4.3 Planejamento experimental

Utilizando o software Minitab 16 foi elaborado o planejamento experimental fracionado do tipo 2^{7-3} . A tabela 2 mostra os fatores e suas codificações. Na tabela 3 encontram-se os fatores utilizados e as condições experimentais determinadas.

Tabela 2 - Descrição dos fatores e suas codificações.

Fatores	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
Alça do reagente (μL)	151	603
Alça da amostra (μL)	151	427
Bobina reacional (μL)	422	804
Vazão (mL min^{-1})	1,05	1,9
[HCl] (mol L^{-1})	0,01	0,08
[PABA] (mg L^{-1})	1000	6000
[Ácido barbitúrico] (mg L^{-1})	200	1000

Tabela 3 - Tabela de ensaios mostrando os fatores codificados utilizados no planejamento experimental.

Ensaio	Alça do reagente	Alça da amostra	Bobina reacional	Vazão	[HCl]	[PABA]	[Ácido barbitúrico]
01	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
02	1	1	-1	-1	-1	1	1
03	-1	-1	1	-1	1	1	1
04	1	1	1	-1	1	-1	-1
05	1	-1	-1	1	1	1	-1
06	-1	1	-1	1	1	-1	1
07	1	-1	1	1	-1	-1	1
08	-1	1	1	1	-1	1	-1
09	1	-1	-1	-1	1	-1	1
10	-1	1	-1	-1	1	1	-1
11	1	-1	1	-1	-1	1	-1
12	-1	1	1	-1	-1	-1	1
13	-1	-1	-1	1	-1	1	1
14	1	1	-1	1	-1	-1	-1
15	-1	-1	1	1	1	-1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1

Os resultados de absorvância obtidos estão dispostos na tabela 4. O tratamento dos resultados foi realizado nos softwares Minitab 16 e STATISTICA versão 8.0.

Tabela 4 - Resultados dos ensaios do planejamento experimental.

Ensaio	Absorbância média ($\lambda = 390$ nm)
01	0,049 \pm 0,001
02	0,984 \pm 0,010
03	0,399 \pm 0,006
04	0,092 \pm 0,001
05	0,179 \pm 0,001
06	0,034 \pm 0,001
07	0,087 \pm 0,001
08	0,207 \pm 0,005
09	0,058 \pm 0,001
10	0,168 \pm 0,001
11	0,725 \pm 0,020
12	0,250 \pm 0,003
13	0,305 \pm 0,002
14	0,063 \pm 0,001
15	0,019 \pm 0,001
16	1,503 \pm 0,004

A Figura 15 mostra os gráficos de efeitos principais dos fatores escolhidos. Quanto maior a inclinação mais o efeito influencia na resposta, logo observa-se que a concentração de PABA é efeito que mais influencia na resposta.

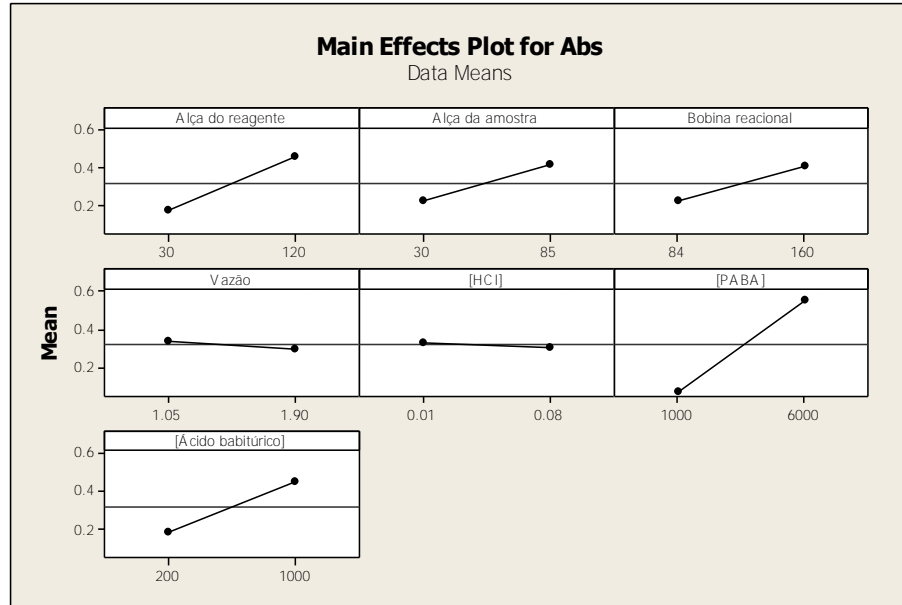


Figura 15 - Gráficos de efeitos principais. Obs.: os valores da alça de reagente, amostra e bobina reacional estão em função do comprimento, os valores: 30 equivalem a 151 μL ; 84 equivale a 422 μL ; 85 equivale a 427 μL ; 120 equivale a 603 μL e 160 equivale a 804 μL .

Pelo gráfico de Pareto, Figura 16, pode-se constatar que a concentração de PABA foi o único fator que apresenta influência significativa sobre a reação. Os fatores que se encontram abaixo da linha tracejada em vermelho não exercem influência significativa sobre a reação a um nível de 95% de confiança. O PABA exerce uma influência positiva sobre a reação, ou seja, quanto maior sua concentração maior será a resposta, nesse caso a absorvância; entretanto como não seria possível aumentar a concentração do PABA, como sugeria o gráfico de Pareto, pois ocorre a precipitação do reagente, essa opção foi descartada.

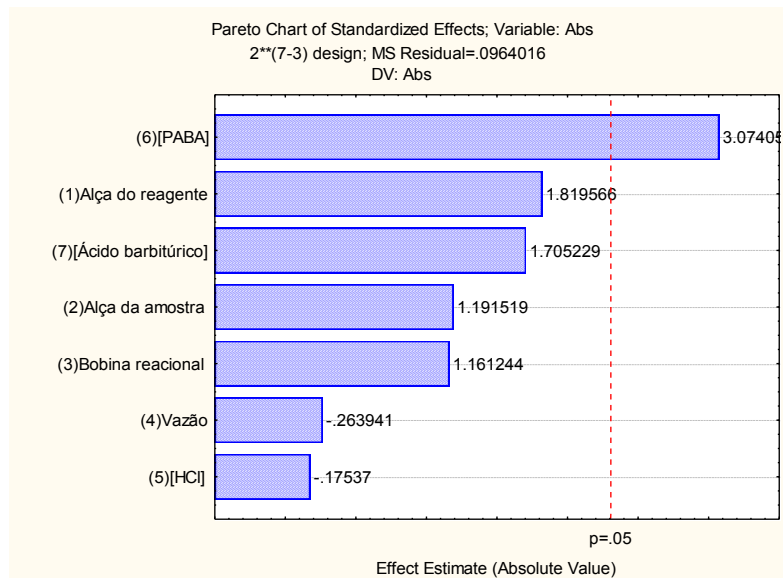


Figura 16 - Gráfico de Pareto.

4.4 Planejamento univariado

O planejamento univariado foi realizado a fim de melhorar a sensibilidade do método. O parâmetro escolhido foi o volume da bobina reacional, pois como apresentado no tópico 2.3 estabilidade do produto da reação, quanto maior o tempo de reação, melhor a sensibilidade; assim ao aumentarmos o volume da bobina reacional logo o seu comprimento, mais tempo a solução que estará reagindo levará para percorrer o caminho até o detector sendo esta reação mais completa, aumentando o valor da absorbância e mais uma vez aumentando a sensibilidade. Foram testados 4 tamanhos diferentes entre a 804 à 1105 μL . Os resultados estão dispostos na Figura 17.

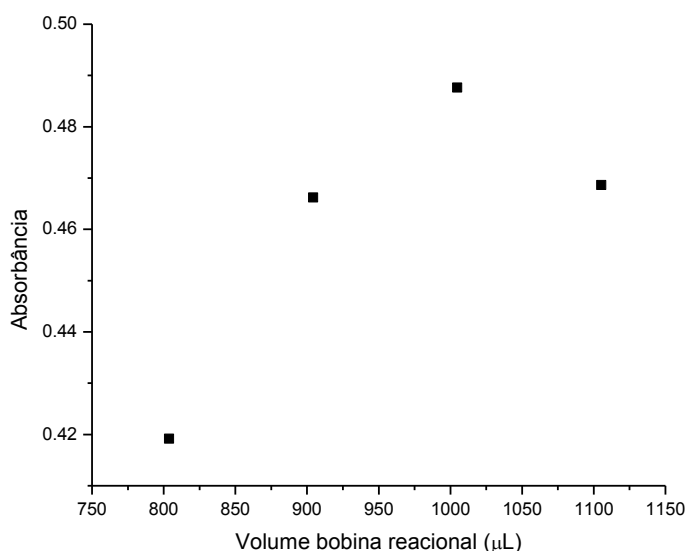


Figura 17 - Gráfico de absorbância versus volume da bobina reacional (μL) para os volumes 804, 904, 1005 e 1105 μL ; $b = 1 \text{ cm}$.

Observando o gráfico da Figura 17 podemos concluir que o aumento do volume da bobina reacional melhora a sensibilidade até um volume máximo de 1005 μL , depois desse ponto o aumento do volume passa a influenciar de forma negativa na absorbância, devido a dispersão dos reagentes e amostra um maior volume de fluido carregador. Assim o volume escolhido para prosseguir os estudos foi de 1005 μL .

4.5 Curva analítica

As condições ótimas para a realização da curva analítica foram: volume das alças de reagente e amostra de 603 e 427 μ L respectivamente; volume da bobina reacional foi de 1005 μ L; vazão foi de 1,9 ml min⁻¹; concentração de HCl foi 0,08 mol L⁻¹ e concentração de PABA e ácido barbitúrico foram 6000 e 1000 mg L⁻¹ respectivamente.

Após a otimização do método foi construída a curva analítica, Figura 18, a qual apresentou faixa linear de 1,00 mg L⁻¹ a 40,0 mg L⁻¹, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999. A equação da reta obtida foi $A=0,00103+0,03069[HMF]$. A curva analítica obtida mostrou-se repetitiva em experimentos realizados no mesmo dia e em dias diferentes.

Calculou-se os limites de detecção ($LD = 3,3 \text{ SD curva analítica} / \text{inclinação da reta}$) e de quantificação ($LQ = 10 \text{ SD curva analítica} / \text{inclinação da reta}$) para o método proposto (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012) o desvio padrão da curva foi de 0,00404, o LD e LQ foram de 0,43 mg L⁻¹ e 1,32 mg L⁻¹ respectivamente.

Apesar do valor do LQ ser alto não significa que medidas não podem ser feitas abaixo desse valor, a quantificação é possível, porém se torna pouco confiável já que a incerteza associada a ele é maior que o valor medido. A quantificação se torna confiável quando o valor da medida é maior que o valor da incerteza (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

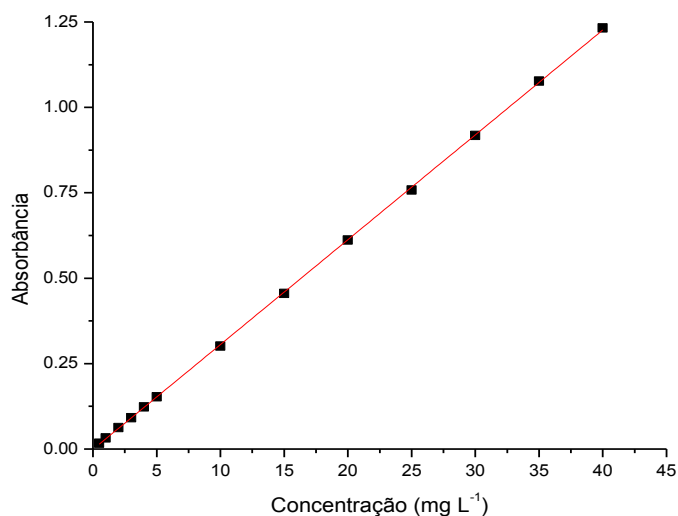


Figura 18 - Curva analítica do 5-hidroximetil-2-furfural, faixa linear de 0,5 a 40,0 mg L⁻¹, $\lambda = 390 \text{ nm}$ e $b = 1 \text{ cm}$.

Foram calculados a repetibilidade da curva analítica. A repetibilidade é expressa pela porcentagem do desvio padrão relativo (% relative standard deviation - %RSD) (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004), seguindo a equação (2):

$$\%RSD = \frac{100 \times SD}{\bar{x}} \quad \text{equação (2)}$$

A porcentagem do RSD pode variar conforme a matriz e a concentração, em matrizes alimentícias esse valor pode variar entre 2 a 20%, para concentrações em torno de 10 mg L⁻¹ o valor estimado da porcentagem de RSD pode variar até 7,3 % RSD (HUBER, 1999). Os valores obtidos encontram-se na Tabela 5. Pode-se verificar que os mesmos se encontram na faixa permitida.

Tabela 5 - Porcentagem de repetibilidade intra-dia e inter-dia para o HMF.

Concentração	5 mg L ⁻¹	20 mg L ⁻¹
Repetibilidade intra-dia (% RSD)	0,6	1,8
Repetibilidade inter-dia (% RSD)	2,3	3,5

4.6 Tratamento das amostras

Duas alíquotas de uma amostra de mel foram analisadas sem um pré-tratamento da amostra, uma alíquota foi fortificada e outra não foi fortificada, e as mesmas foram comparadas a um padrão contendo 2,04±0,02 mg L⁻¹ de HMF (Figura 19). A alíquota fortificada apresentou uma concentração de 2,58±0,02 mg L⁻¹, sendo esta concentração maior do a concentração esperada pela adição de padrão. Esta diferença não é referente a uma presença prévia de HMF no mel, já que o mel não apresentava HMF. A alíquota não fortificada apresentou um aumento de sinal em toda a região do espectro no qual foi realizada a varredura (380-800 nm), este sinal é referente ao efeito Schlieren, indicando que a amostra sem fortificação não apresentava sinal referente ao HMF. As perturbações causadas pelo efeito Schlieren foram descontadas.

O efeito Schlieren é um fenômeno causado por gradientes de índice de refração formados durante o transporte das soluções pelo fluxo ou na zona da

amostra, perturbando assim os sinais transientes. Quando as soluções das amostras apresentam composição físico-química distinta do fluido carregador, a forma e a altura dos sinais transientes podem ser modificadas. Uma das formas de eliminar o efeito Schlieren é a realização de medidas espectrofotométricas em dois comprimentos de onda. O primeiro comprimento de onda é o ponto do sinal analítico mais uma absorção não específica, o segundo comprimento é o ponto onde a absorção do analito é desprezível tendo apenas o sinal do efeito Schlieren. A diferença entre os dois sinais é proporcional a concentração do analito usado para quantificação (ROCHA; NOBREGA, 1996).

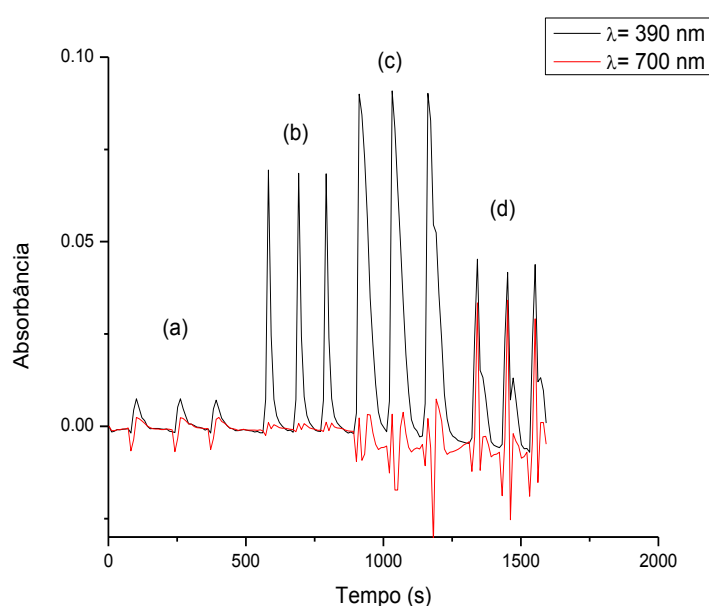


Figura 19 - Diagrama do teste com amostra 2 (a) branco, (b) solução padrão $2,04 \pm 0,02 \text{ mg kg}^{-1}$, (c) solução da amostra fortificada, (d) solução da amostra pura. $\lambda=390 \text{ nm}$ e $b=1 \text{ cm}$.

Para encontrar o valor de HMF em mg L^{-1} utilizou a equação (2). Os valores 0,00103 e 0,03069 são, respectivamente, os coeficientes linear e angular da reta obtida pela curva de calibração.

$$\frac{\text{mg HMF}}{L} = \frac{(A_{390} - A_{700}) + 0,00103}{0,03069} \quad \text{equação (2)}$$

Com o intuito de diminuir a interferência da matriz na análise buscou-se a realização do pré-tratamento da amostra. Segundo a metodologia oficial da AOAC

(HORWITZ, 2005), as amostras antes de serem analisadas, passam por uma etapa de clarificação, utilizando duas soluções chamadas de Carrez I e II. Segundo Känzig, Kaufmann e Bogdanov (2001) a utilização das soluções de Carrez I e II são necessárias no preparo de amostra, pois o HMF em solução tem sua concentração diminuída com o tempo devido à provável presença de enzimas de origem das abelhas. Assim foram utilizadas as soluções de Carrez no preparo da amostra conforme o utilizado no método oficial da AOAC (HORWITZ, 2005). A partir desse tópico todas as amostras passaram a ser tratadas seguindo as instruções do tópico “3.2.2.6.2 Tratamento de clarificação das amostras” do procedimento experimental.

4.7 Estudo de interferentes

Foram testados três interferentes sendo eles frutose, glicose e sacarose. Esses compostos foram escolhidos por serem os três principais constituintes do mel. Os testes foram realizados nas proporções 1:1 e 1:10 de analito:interferente, também foram realizadas análises apenas da presença dos interferentes, não sendo observada a interferência desses compostos nas análises. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Porcentagem de recuperação de 2,00 mg L⁻¹ de HMF para o estudo com interferentes.

Interferente	Recuperação (%)	Recuperação (%)
	proporção 1:1	proporção 1:10
Glicose	101,28±0,57	101,38±0,17
Frutose	102,21±0,79	102,91±0,93
Sacarose	104,60±1,32	104,39±1,61

4.8 Adição de padrão e recuperação

O método de adição de padrão foi aplicado a fim de verificar a exatidão do método e a interferência de substâncias contidas na amostra quando se faz quantificação do analito, ou seja, verificar o efeito da matriz (SKOOG; WEST; HOLLER, 2007). A tabela 7 apresenta os resultados de adição de padrão e recuperação para o mel de laranjeira.

Tabela 7 - Resultados para o estudo de adição de padrão e recuperação do HMF em mel de laranjeira.

Adição (%)	Adição de HMF (mg L⁻¹)	Concentração de HMF obtida (mg L⁻¹)	Recuperação (%)
0	2,00	2,08±0,01	103,9±0,7
50	3,00	2,85±0,09	94,84±3,06
100	4,00	3,70±0,02	92,38±0,41
150	5,00	4,43±0,05	88,55±1,05
200	6,00	5,51±0,08	91,89±1,31
250	7,00	6,45±0,13	92,09±1,86
300	8,00	7,07±0,06	88,43±0,79

Obs.: a amostra de mel era ausente do analito, então foi escolhido um ponto da curva para ser o ponto inicial da adição, neste caso 2,00 mg L⁻¹ de HMF.

Um segundo estudo de adição de padrão e recuperação foi realizado em uma segunda flora, eucalipto, os resultados obtidos estão indicados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados para o estudo de adição de padrão e recuperação do HMF em mel de eucalipto.

Adição (%)	Adição de HMF (mg L⁻¹)	Concentração de HMF obtida (mg L⁻¹)	Recuperação (%)
0	2,00	2,08±0,08	103,8±3,8
50	3,00	2,98±0,07	99,35±2,33
100	4,00	3,73±0,02	93,33±0,51
150	5,00	4,70±0,05	94,04±1,00
200	6,00	5,46±0,03	91,05±0,44
250	7,00	6,43±0,11	91,80±1,62
300	8,00	7,42±0,15	92,71±1,82

Obs.: a amostra de mel era ausente do analito, então foi escolhido um ponto da curva para ser o ponto inicial da adição, neste caso 2,00 mg L⁻¹ de HMF.

Os resultados de recuperação mostram que o método apresenta boa exatidão para aplicação de HMF em mel, assim pode-se observar que a matriz não influencia significativamente na análise, ou seja, não há o efeito de matriz. Para matrizes complexas com uma concentração do analito entre 1 a 10 mg L⁻¹ a porcentagem da

recuperação pode variar entre 80 a 110% (HUBER, 1999), assim observa-se que para ambas as floras a porcentagem de recuperação encontra-se dentro da faixa estipulada.

4.9 Análises de amostras

O método proposto foi aplicado a sete amostras diferentes, de floras diferentes. A procedência das amostras encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Amostras utilizadas no método desenvolvido.

Amostra	Flora	Procedência	Lote
1	Assa Peixe Branco	Apiário (Paraná)	94
2	Cipó-Uva	Apiário local (São Paulo)	-
3	Eucalipto	Apiário local(São Paulo)	-
4	Laranjeira	Apiário local (São Paulo)	-
5	Não indicado	Supermercado local (São Paulo)	68
6	Laranjeira	Apiário (Paraná)	71
7	Silvestre	Supermercado (Rio Grande do Norte)	02/2014

Como dito anteriormente o método foi aplicado a sete amostras de méis de procedência e floras distintas mostrando que o método pode ser aplicado a um conjunto de amostras independente de sua flora.

A metodologia desenvolvida foi comparada ao método oficial 980.23 para hidroximetilfurfural em mel da AOAC (HORWITZ; 2005). Os resultados estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação entre os resultados obtidos no método desenvolvido e no método oficial.

Amostra	Concentração de HMF (mg kg ⁻¹) método desenvolvido	Concentração de HMF (mg kg ⁻¹) método oficial ^a	Teste t^b	Teste F^c
1	34,62±0,62	34,04±1,38	0,64	4,91
2	27,36±0,92	27,09±0,88	0,28	1,09
3	0	0	-	-
4	0	2,66±0,11	-	-
5	25,70±0,64	22,44±2,55	1,78	15,9
6	14,55±1,92	10,73±0,72	2,72	7,03
7	32,10±0,75	32,55±0,80	0,67	1,17

a - método oficial 980.23 para hidroximetilfurfural em mel da AOAC (HORWITZ; 2005).

b- o valor de t_{tabelado} é 4,303.

c- o valor do F_{tabelado} é 19.

O teste estatístico teste t é utilizado para se comparar um grupo de medidas com outro para verificar se eles são “diferentes” ou não. O teste F é utilizado para saber se dois desvios-padrão são “significativamente” diferentes entre si, onde F é o quociente quadrado dos desvios-padrão (HARRIS, 2005). Neste caso foi utilizado a fim de comparar o grupo de medidas do método oficial com o do método desenvolvido para saber se são diferentes ou não.

Na comparação ente o método oficial e o método desenvolvido, para as amostras 1, 2, 5, 6, e 7 o $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o t_{tabelado} , assim concluiu-se que os métodos não são diferentes a um nível de 95% de confiança. No teste F os valores do $F_{\text{calculado}}$ também foram menores que os valores do F_{tabelado} , mostrando que os desvios-padrão não se diferem entre si a um nível de 95% de confiança.

Para as amostras 3 e 4 não foi possível calcular o $t_{\text{calculado}}$ e o $F_{\text{calculado}}$ já que as amostras não apresentaram HMF, não sendo possível encontrar a média e desvio-padrão para aplicar os cálculos estatísticos.

O método desenvolvido também foi comparado com o método por CLAE descrito nos métodos harmonizados da comissão internacional do mel (BOGDANOV, 2009). Os resultados estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparação entre os resultados obtidos no método desenvolvido e no método por CLAE.

Amostra	Concentração de HMF (mg kg ⁻¹) método desenvolvido	Concentração de HMF (mg kg ⁻¹) método por CLAE ^a	Teste t^b	Teste F^c
1	34,62±0,62	27,43±0,29	8,27*	4,65
2	27,36±0,92	28,27±0,56	1,60	2,71
3	0	0	-	-
4	0	2,82±0,17	-	-
5	25,70±0,64	20,33±2,43	3,75	14,5
6	14,55±1,92	15,95±0,12	1,20	262
7	32,10±0,75	28,90±1,44	3,89	1,78

a - método descrito nos métodos harmonizados da comissão internacional do mel (BOGDANOV, 2009)

b- o valor de t_{tabelado} é 4,303.

c- o valor do F_{tabelado} é 19.

* Neste caso o teste foi realizado a um nível de 99,5% de confiança e o valor do t_{tabelado} é 14,089.

Na comparação entre o método por CLAE e o método desenvolvido, para as amostras 2, 5, 6, e 7 o $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o t_{tabelado} , assim concluiu-se que os métodos não são diferentes a um nível de 95% de confiança. O teste t foi aplicado a amostra 1 a um nível de 99,5% de confiança, ou seja, neste nível de confiança o $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o t_{tabelado} e neste nível os métodos não são diferentes estatisticamente.

No teste F os valores do $F_{\text{calculado}}$ foram menores que os valores do F_{tabelado} , para as amostras 1, 2, 5 e 7, mostrando que os desvios-padrão não se diferem entre si a um nível de 95% de confiança. Para a amostra 6 o valor do $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o valor do F_{tabelado} , ou seja, os desvios-padrão diferem entre si.

No caso das amostras 3 e 4, o teste estatístico não pode ser aplicado como mostrado anteriormente.

No trabalho de Zappalà et al. (2005) é mostrado um exemplo onde o resultado do método por CLAE não condiz com o método oficial, eles não conseguiram explicar o porque, entretanto sugeriram que alguns precursores do HMF, formados no aquecimento ou no envelhecimento, interferem nas análises utilizando o método oficial. Segundo Truzzi et al. (2012) para concentrações menores que 4 mg kg⁻¹ é recomendado a utilização do método por CLAE ao invés do método oficial.

A Tabela 12 mostra uma comparação entre a produção de resíduos, o tempo de análise e o uso de solventes por análise, conforme os três métodos. Observando a tabela observa-se que o método desenvolvido é mais limpo e mais rápido que os métodos descritos na literatura para a determinação de HMF em mel, a taxa de amostragem é de 20 amostras por hora, baixo consumo de reagentes e amostra (consumo por análise: 3,62 mg de PABA, 0,60 mg de ácido barbitúrico e 427 μ L de amostra) e mínima produção de resíduos (em torno de 5,7 mL por análise).

O HMF tem uma estabilidade de aproximadamente quatro horas em solução aquosa de mel quando não se utiliza as soluções de Carrez, sendo um problema sua determinação segundo a metodologia por CLAE, essa metodologia também apresenta a desvantagem da utilização do metanol como já dito anteriormente. Já o método oficial segundo a AOAC, também conhecido como método de White, utiliza o bissulfito de sódio que apresenta certa toxicidade, outra desvantagem dessa metodologia é o comprimento de onda onde é realizada a leitura de absorbância que apresenta problemas com interferentes nas medidas. Assim a utilização do método desenvolvido é viável, pois utiliza reagentes menos tóxicos, produz menor quantidade de resíduos os resultados foram condizentes estatisticamente com ambos os métodos aceitos pela comissão internacional do mel.

Tabela 12 – Comparação dos consumos por análise.

Quesito	Método desenvolvido	Método oficial segundo a A.O.A.C.	Método por CLAE
Uso de solvente orgânico	-	-	metanol
Reagente utilizado por análise	3,62 mg de PABA e 0,60 mg de ácido barbitúrico	10 mg	1,3 mL
Massa de amostra (mg)	21,35	500	4
Tempo de análise (min)	≈3	≈5	13

5 CONCLUSÃO

A metodologia proposta se mostrou eficiente na determinação do HMF e ambientalmente mais amigável que o método oficial de Winkler, uma vez que ele utiliza um composto menos tóxico para saúde humana, ácido p-aminobenzóico, em relação ao composto utilizado no método oficial, p-toluidina. Outro fator importante foi a utilização do sistema FIA, onde o analista tem menos contato com reagentes e resíduos, menor geração de resíduos e diminui os erros do analista já que o sistema é automatizado, diferente do método de Winkler e do método oficial da AOAC que são em batelada. O método proposto foi aplicado às amostras de forma eficiente, não apresentando diferenças estatísticas em relação os métodos descritos na literatura.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras de trabalho no grupo de pesquisa pode-se citar a aplicação da metodologia a outras classes de alimentos; a utilização da reação descrita no presente trabalho em outras técnicas, como por exemplo, aplicado a técnica de refletância difusa e o estudo do caminho reacional a fim de se conhecer melhor a reação e assim melhora-la para alcançar uma melhor sensibilidade da técnica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-AAL, E.-S. M.; ZIENA, H. M.; YOUSSEF, M. M. Adulteration of honey with high-fructose corn syrup: detection by different methods. **Food Chemistry**, v. 48, p. 209-212, 1993.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Poder Executivo, 03 maio 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fbc4c6735/RESOLUCAO_18_1999.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 jul. 2014.

AJLOUNI, S.; SUJIRAPINYOKUL, P. Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1000-1005, 2010.

ANASTAS, P. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p.167-175, 1999.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 301-312, 2010.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry**: theory and practice. New York: Oxford University Press, 2000. Chap. 2, p. 11-20.

BARCELOUX, D. G. et al. American academy of clinical toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 415-446, 2002.

BELITZ, H.-D.; GROSCHE, W.; SCHIEBERLE, P. Carbohydrates. In.:_____. **Food Chemistry**. 4th ed. New York: Springer, 2009. Chap. 4, p. 248-339.

BOGDANOV, S. **Harmonized methods of the international honey commission**. Bern: International Honey Commission, 2009. 63 p. Disponível em: <<http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>>. Acesso em: 06 ago. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 out. 2000. Seção 1, p. 16-17. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 06 ago. 2014.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): a review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 793-810, 2011.

CORRÊA, A. G.; ZUIN, V. G. Princípios fundamentais de química verde. In: _____. **Química verde: fundamentos e aplicações**. São Carlos: EdUFSCar, 2009. v. 5, Cap. 1, p. 9-19.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1985. 226 p.

ESPINOSA-MANSILLA, A.; PEÑA, A. M. de la; SALINAS, F. Semiautomatic determination of furanic aldehydes in food and pharmaceutical samples by a stopped-flow injection analysis method. **Journal of AOAC International**, v. 76, n. 6, p. 1255-1261, 1993.

EUROPEAN UNION. Council directive 2001/110/EC of 20 December 2001. Relating to honey. **Official Journal of the European Communities**, 12 Jan. 2002. L 10/47-10/52. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:010:0047:0052:EN:PDF>>. Acesso em: 13 set. 2012.

FALLICO, B. et al. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 305-313, 2004.

FEÁS, X. et al. Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3462-3470, 2010.

FEIJÓ, L. D. et al. **The importance of good apicultural practices aiming health and honey quality in Brazil**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/APIMONDIA_2013.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2014.

FOLEY, W. M. Jr.; SANFORD, G. E.; McKENNIS, H. Jr. The mechanism of the reaction of aniline with furfural in the presence of acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 5489-5491, 1952.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Report of the seventh session of the Codex Committee on Sugars**. London. 2000. 37 p. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/input/download/report/277/AI01_25e.pdf>. Acesso em: 13 set. 2012.

HARRIS, D. C. Estatística. In: _____. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. Cap. 4, p. 64-81.

HORWITZ, W. (Ed.). Sugar and sugar products. In: _____. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th ed. Maryland: AOAC International, 2005. Chap. 44, p. 32.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC Magazine**. 1999. Disponível em: <<http://geocities.internetarchaeology.org/HotSprings/Spa/6896/methval.pdf>>. Acesso em: 06 ago. 2014.

IGLESIA, F. de la. et al. Automatic determination of 5-hydroxymethylfurfural (5-HFM) by a flow injection method. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 245-250, 1997.

ISLAM, N. et al. Toxic compounds in honey. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 7, p. 733-742, 2014.

KÄZIG, A.; KAUFMANN, D.; BOGDANOV, S. **Stability of hydroxymethylfurfural during determination by HPLC**. [2001]. Disponível em: <<http://www.ihc-platform.net/kaenzig2001.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

KIM, H.-J.; RICHARDSON, M. Determination of 5-hydroxymethylfurfural by ion-exclusion chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography**, v. 593, p. 153-156, 1992.

LOMILLO, M. A. A.; CAMPO, F. J. del; PASCUAL, F. J. M. Preliminary contribution to the quantification of HMF in honey by electrochemical biosensor chip. **Electroanalysis**, v. 18, n. 24, p. 2435-2440, 2006.

MENDES, C. de G. et al. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 7-14, 2009.

O'NEIL, M. J. (Ed.). **The Merck index**. 14th ed. Whitehouse Station: Merck, 2006.

p-TOLUIDINA. Darmstadt: Merck KGaA, 2013. Número de produto 1108410050.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101-109, 2012.

RANGEL, R. Mel brasileiro conquista mercado externo. **Revista Brasilis**, n. 10, p. 56-61, 2011.

ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A. Efeito Schlieren em sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 19, n. 6, p. 636-640, 1996.

ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A.; FATIBELLO FILHO, O. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. **Green Chemistry**, v. 3, p. 216-220, 2001.

RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Principles. In.:_____. **Flow injection analysis**. 2nd ed. John Wiley & Sons, 1988. Chap. 2, p. 15-66.

SALINAS, F.; ESPINOSA-MANSILLA, A.; NEVADO, J. J. B. Flow-injection determination of HMF in honey by the Winkler method. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 340, p. 250-252, 1991.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Curvas de titulação para sistemas ácido/base complexos. In.:_____. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007. Cap 15, p. 375-426.

SUAREZ, W. T.; VIEIRA, H. J.; FATIBELLO FILHO, O. Generation and destruction of unstable reagent in flow injection system: determination of acetylcysteine in pharmaceutical formulations using bromine as reagent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 771-775, 2005.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004

TRUZZI, C. et al. Determination of very low levels of 5-(hydroxymethyl)-2-furfuraldehyde (HMF) in natural honey: comparison between the HPLC technique and the spectrophotometric White method. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. C784-C790, 2012.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. R117-R124, 2008.

WHITE, J. W. Jr. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 62, n. 3, p. 7-10, 1979.

WHITE, J. W. Jr.; SICILIANO, J. Hydroxymethylfurfural and honey adulteration. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, n. 1, p. 7-10, 1980.

WUNDERLIN, D. A. et al. Decomposition of hydroxymethylfurfural in solution and protective effect of fructose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1855-1863.

ZAPPALÀ, M. et al. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. **Food Control**, v. 16, p. 273-277, 2005.

ZIRBES, L. et al. Hydroxymethylfurfural: a possible emergent cause of honey bee mortality? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11865-11870, 2013.