RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/12/2018.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara
Departamento de Química Analítica

Maria Izabel Milani

SISTEMA DE SCREENING PARA DETECÇÃO DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL EM BEBIDAS ALCOÓLICAS POR ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA.

Araraquara
2016

Maria Izabel Milani

SISTEMA DE SCREENING PARA DETECÇÃO DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL EM AMOSTRAS DE CACHAÇA POR ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA

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

Orientadora: Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Milani, Maria Izabel
M637s Sistema de sc*reening* para detecção de furfural e hidroximetilfurfural em amostras de cachaça por espectroscopia de reflectância difusa / Maria Izabel Milani – Araraquara : [s.n], 2016
91 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Helena Redigolo Pezza

1. Química analítica. 2. Química verde. 3. Cachaça. 4. Espectrofotometria. 5. Controle de qualidade. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

- ## Dados Pessoais

Nome: Maria Izabel Milani

Filiação: Angela Maria Gabriel Milani e Henrique Donizete Milani

Data de nascimento: 04/08/1991

Naturalidade: Jaú – SP

Nacionalidade: Brasileira

Endereço eletrônico: mariaizabelmilani91@hotmail.com

- ## Formação acadêmica

1. Graduação

Bacharelado em Química pelo Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP)

2. Pós-Graduação

Mestrado em Química Analítica pelo Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP)

- ## Trabalhos apresentados em congressos

1. 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia (SP) de 25 a 28 de maio de 2013.

Título do trabalho: Determinação de sódio em ração de animais domésticos por fotometria de chama

2. XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Araraquara (SP) 18 e 19 de setembro de 2013.

Título do trabalho: Desenvolvimento de metodologia para determinação de sódio em rações de animais domésticos com extração assistida por ultrassom

3. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia (SP) de 26 a 29 de maio de 2014.

Título do trabalho: Nova metodologia ambientalmente amigável de extração de sódio aplicada a rações animais com auxílio de ondas ultrassônica

4. 55ª Congresso Brasileiro de Química. Goiânia (GO) de 02 a 06 de novembro de 2015.

Título do trabalho: Determinação de furfural e hidroximetilfurfural em amostras de cachaça por espectroscopia de reflectância difusa.

- ## Artigos Publicados

1. Milani, M. I. et al. Development of a new clean methodology with ultrasound-assisted extraction for analysis of sodium in pet foods. **Analytical Methods**, v. 7, p. 2433-2436. 2015

2. CASTOLDI, K.; MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Flow injection analysis of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in honey by a modified Winkler method. **Analytical Sciences**, manuscrito aceito.

MARIA IZABEL MILANI

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

Araraquara, 16 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Helena Redigolo Pezza (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Profª Drª Edilene Cristina Ferreira
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia / UFSCAr / São Carlos - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente a meus pais, Angela e Henrique, que, mesmo dentre todas as dificuldades, sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e me guiando.

À minha irmã, Ana Julia, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida, sejam eles bons ou ruins!

Ao Eduardo, sem você eu jamais conseguiria suportar as dificuldades que encontrei pelo caminho. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado e muito obrigada por toda paciência, que eu sei que não foi pouca!

Ao meu avô Dário (*in memoriam)* que partiu de repente, deixando a casa silenciosa, um vazio em nossas vidas e uma saudade inesperada. Muito obrigada por fazer parte do meu cotidiano por tanto tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as conquistas alcançadas até hoje e por nunca me abandonar.

A meus pais, Angela e Henrique. Muito obrigada por me incentivarem e me apoiarem incondicionalmente. Obrigada por acreditarem em mim.

À minha irmã, Ana Julia, por sempre ser muito mais que uma irmã e ter sempre um sorriso sincero para me oferecer.

À minha tia, Edna, por ser minha segunda mãe, por todas as broncas e todos os mimos que uma mãe de verdade tem para com seus filhos.

Ao meu namorado, Eduardo, por sempre estar ao meu lado, por ser meu melhor amigo, por me apoiar de todas as maneiras possíveis e em todos os momentos e principalmente por nunca me abandonar quando mais precisei.

Ao GPFF, em especial, Tiago, Dayana, Vitor, Paulo e Marcos, muito obrigada pela convivência, pelas risadas e por serem minha família araraquarense.

Aos amigos de Araraquara, Felipe e Patrick, a parte dois da família araraquarense, muito obrigada pelas risadas e conversas sem fim.

À Profa. Helena Redigolo Pezza pela orientação, por toda ajuda e atenção e, principalmente, obrigada pelo exemplo profissional.

Ao Prof. Leonardo Pezza pelo apoio e aconselhamento.

Ao Prof. Emanuel Carrilho pelo auxílio e suporte para realização deste projeto.

A todos os professores que tive até hoje. Obrigada sempre pelo exemplo dado e pelo conhecimento compartilhado.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta por mais esta conquista, meu mais sincero, muito obrigada.

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista”.

Aldo Kovak

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

“A tarefa é, não tanto para ver o que ninguém viu ainda, mas pensar o que ninguém ainda pensou, sobre o que todo mundo vê. ”

Erwin Schrödinger

“Você precisa fazer aquilo que pensa que não é capaz de fazer”.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Cachaça é a denominação dada à aguardente de cana-de-açúcar produzida no Brasil com teor alcóolico entre 38-48% (v/v). Um dos parâmetros de qualidade determinado neste tipo de amostra é a somatória de furfural e hidroximetilfurfural, com máximo em 5 mg para cada 100 mL de etanol anidro. Essas substâncias, além de conferir sabor desagradável à bebida possuem potencial mutagênico/ carcinogênico. As metodologias de análise geralmente utilizadas para determinação destes analitos se utilizam de técnicas cromatográficas que, além do elevado custo do equipamento e de manutenção, requem operadores capacitados e utilizam solventes orgânicos tóxicos, nocivos à saúde do operador e ao meio ambiente. Sendo assim, em sua maioria, as técnicas cromatográficas são contrárias aos princípios da Química Verde. Dessa maneira, no presente trabalho foi desenvolvida uma nova metodologia para determinação de furfural e hidroximetilfurfural em amostras de cachaça que seja mais rápida, barata e ambientalmente mais amigável que as metodologias cromatográficas usualmente utilizadas, com detecção por espectroscopia de reflectância difusa. O método desenvolvido apresentou duas curvas analíticas, sendo a do furfural A_R = 27,117 $C^{1/2}$ - 0,0271 com R = 0,997 e a do hidroximetilfurfural A_R = 15,822 $C^{1/2}$ - 0,0263 com R = 0,998. Os limites de quantificação obtidos para cada um dos analitos determinados foram de 7,70x10^{-6} mol L^{-1} para o furfural e de 1,00x10^{-5} mol L^{-1} para o hidroximetilfurfural. Os testes para avaliação de interferência da matriz apresentaram resultados de recuperação entre 89,5 e 108%, concluindo que a matriz não influencia de maneira significativa na determinação dos analitos. A metodologia desenvolvida foi comparada com um método já descrito na literatura, os resultados obtidos foram comparados estatisticamente pelo teste t de Student, os valores de t calculados foram numericamente inferiores que o valor de t tabelado, indicando que não há diferença estatística entre os valores encontrados pelas duas metodologias.

Palavras-chave: Cachaça. Furfural. Hidroximetilfurfural. Reflectância. Química verde

ABSTRACT

Cachaça is the name given to sugarcane spirits produced in Brazil with alcohol content from 38 to 48% (v/v). One of the quality parameters analyzed is the sum of furfural and hydroxymethylfurfural, with a maximum value of 5 mg per each 100 mL of anhydrous ethanol. These two substances have a mutagenic/carcinogenic power, besides they give a bad flavor to the beverages. The methodologies usually used to determinate the anlytes are chromatographic techniques that, besides the high cost of the equipaments and its maintenance, they need toxic organic solvents that are harmful to operators and the environment. Therefore, chromatographic techniques are mostly against Green Chemistry principles. In this way, the present study aims to develop a new methodology to determinate furfural and hydroxymethylfurfural in cachaça samples that is faster, cheaper and more eco-friendly than the chromatographic methods usually used, with detection by diffuse reflectance spectroscopy. In the method here described, it was obtained two analytical curves; furfural curve is $A_R = 27.117\ C^{1/2} - 0.0271$ with R = 0,997 and hydroxymethylfurfural curve is $A_R = 15.822\ C^{1/2} - 0.0263$ with R = 0,998. Limits of quantification for each analyte were determined as 7.70×10^{-6} mol L^{-1} to furfural and 1.00×10^{-5} mol L^{-1} to hydroxymethylfurfural. The test to evaluate matrix interference shows a recovery result between 89,5 and 108%, indicating that the matrix does not have a significant interference in analytes determination. The develop methodology was compared against a methodology already described in literature; the results were compared statically by Studant's t-test, the calculated values for t-test were numerically lower then the table value, indicating that there is no significant statistic difference between values found by both methods.

Keywords: Cachaça. Furfural. Hydroxymethylfurfural. Reflectance. Green chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma das etapas de produção da cachaça 19

Figura 2 – Fórmula estrutural do (a) FUR (b) HMF 20

Figura 3 – Esquema representando (a) reflexão especular (b) reflexão difusa 25

Figura 4 – Esquema representativo da impregnação das barreiras hidrofóbicas no papel de filtro. Corte lateral do papel; em (a) tem-se a camada de cera depositada sobre o papel, já em (b) nota-se que a cera penetrou nos poros do papel depois do aquecimento. O traço amarelo representa a espessura do papel, enquanto o vermelho representa a espessura da camada de cera 27

Figura 5 – Esquema representativo das metodologias de *screening* 28

Figura 6 – Esquema de *screening* direto 30

Figura 7 – Esquema de *screening* com pré-tratamento rápido 31

Figura 8 – Esquema de *screening* com pré-tratamento completo 31

Figura 9 – Procedimento para reação no *spot-test* 38

Figura 10 – Suporte utilizado para aplicação de *spot-test* 38

Figura 11 – Esquema representativo de metodologias de *screening* associadas à metodologias de *spot-test* 39

Figura 12 – Produto da reação do PABA e AB com (a) FUR (b) HMF nas concentrações de 100 mg L^{-1} cada um dos analitos 44

Figura 13 – Espectro de absorção do produto obtido a partir da reação do PABA 0,054 45

Figura 14 – Espectro de absorção do produto obtido a partir da reação do 0,054 mol L^{-1} e AB 0,017 mol L^{-1} com HMF 7,93 x 10^{-4} mol L^{-1} 45

Figura 15 – A_R em função da porcentagem (%) de etanol na solução de analito de concentração igual a 50 mg L^{-1} em λ = 616 nm (n=3) 47

Figura 16 – Coloração do produto obtido pela reação de PABA e AB com (a1) FUR, no papel sem barreiras hidrofóbicas (b1) HMF no papel sem barreiras hidrofóbicas (a2) FUR no papel com barreiras hidrofóbicas (b2) HMF no papel com barreiras hidrofóbicas. A concentração de ambos os analitos é igual a 25 mg L^{-1}. 48

Figura 17 – Reação do PABA e AB com HMF 50

Figura 18 – Reação do PABA e AB com FUR 50

Figura 19 – Fragmentograma referente ao produto formado pela reação com HMF 51

Figura 20 – Fragmentograma referente ao produto formado pela reação com FUR 52

Figura 21 – Gráfico de efeitos principais para reação com FUR 54

Figura 22 – Gráfico de efeitos principais para reação com HMF 55

Figura 23 – Gráfico de Pareto para reação do PABA e AB com FUR 56

Figura 24 – Gráfico de Pareto para reação do PABA e AB com HMF 56

Figura 25 – Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) para reação com FUR 59

Figura 26 – Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) para reação com HMF 61

Figura 27 – Resultado do teste de estabilidade ótica para (a) FUR (25 mg L^{-1}) (b) HMF (50 mg L^{-1}). 64

Figura 28 – Curva analítica A_R em função da concentração de furfural. 65

Figura 29 – Curva analítica A_R em função da raiz quadrada concentração de furfural. Equação de reta: $A_R = 27,117\ C^{1/2} - 0,0271$ e R 0,997 e n=3 66

Figura 30 – Curva analítica A_R em função da concentração de HMF 67

Figura 31 – Curva analítica A_R em função da raiz quadrada concentração de HMF. Equação de reta: $A_R = 15,822\ C^{1/2} - 0,0263$ e R = 0,998 e n=3 68

Figura 32 – Cromatograma obtido da mistura dos padrões de FUR com t_R 5,8 min 77

Figura 33 – Curva analítica da Área em função da C_{FUR} (mg L^{-1}) 77

Figura 34 – Curva analítica da Área em função da C_{HMF} (mg L^{-1}). 78

Figura 35 – Cromatograma referente a amostra F 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de diferentes métodos de análise de FUR e/ou HMF em matrizes diversas 22

Tabela 2 – Descrição dos valores e suas codificações para o planejamento fatorial 41

Tabela 3 – Ensaios mostrando os fatores codificados utilizados durante o planejamento fatorial 41

Tabela 4 – Intervalo de valores dos fatores analisados na superfície de resposta 42

Tabela 5 – Condições cromatográficas da metodologia comparativa (Alcázar, 2006) 43

Tabela 6 – Resultados das medidas de densidade ótica de medidas de reflectância (A_R) para os testes de ordem de adição (n=3) 46

Tabela 7 – Valores de A_R obtidos em diferentes meios 47

Tabela 8 – Valores de A_R encontrados para os suportes sólidos com e sem as barreiras hidrofóbicas impregnadas 49

Tabela 9 – Resultados obtidos nos ensaios do planejamento fatorial 53

Tabela 10 – Parâmetros analisados na superfície de resposta do FUR com seus respectivos resultados (n=3) 58

Tabela 11 – Parâmetros analisados na superfície de resposta do HMF com seus respectivos resultados (n=3) 60

Tabela 12 – Parâmetros otimizados para determinação dos analitos 62

Tabela 13 – Valores A_R para HMF e FUR no teste de estabilidade ótica 63

Tabela 14 – Dados da curva analítica do FUR 69

Tabela 15 – Dados da curva analítica do HMF 69

Tabela 16 – Valores de LD e LQ para reações com FUR e HMF 70

Tabela 17 – Resultado da repetibilidade intradia e interdia para o furfural (n=3) 70

Tabela 18 – Resultado da repetibilidade intradia e interdia para o HMF (n=3) 70

Tabela 19 – Resultados para os testes de adição de padrão e recuperação para furfural em amostras de cachaça adoçada 72

Tabela 20 – Resultados para os testes de adição de padrão e recuperação para HMF em amostras de cachaça adoçada 72

Tabela 21 – Resultados para os testes de adição de padrão e recuperação para furfural em amostras de cachaça envelhecida 72

Tabela 22 – Resultados para os testes de adição de padrão e recuperação para HMF em amostras de cachaça envelhecida. 73

Tabela 23 – Amostras de cachaças analisadas no presente trabalho 74

Tabela 24 – Determinação de HMF em amostras de cachaça 75

Tabela 25 – Determinação de FUR em amostras de cachaça..... 75

Tabela 26 – Determinação de FUR e HMF em amostras de cachaça 75

Tabela 27 – Determinação de HMF em amostras de cachaça pela metodologia comparativa 79

Tabela 28 – Determinação de FUR em amostras de cachaça pela metodologia comparativa 80

Tabela 29 – Determinação de FUR e HMF em amostras de cachaça pela metodologia comparativa..... 80

Tabela 30 – teste t de Student para determinação de HMF em amostras de cachaça 81

Tabela 31 – teste t de Student para determinação de FUR em amostras de cachaça..... 81

Tabela 32 – Resultados da somatória de HMF e FUR por ambas as metodologias 82

Tabela 33 – Comparação entre as metodologias proposta e HPLC 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	microlitro
µPAD	Dispositivo analítico microfluído em papel (do inglês Microfluidic Paper Analytical Device)
AB	Ácido barbitúrico
ACN	Acetonitrila
A_R	Densidade ótica de medidas de reflectância difusa
C ou Conc	concentração
ºC	grau Celsius
DAD	Detector de arranjo de diodo (do inglês Diode Array Detector)
ERD	Espectroscopia de reflectância difusa
FID	Detector por ionização em chama (do inglês Flame Ionization Detector)
FM	Fase móvel
FUR	furfural
g	grama
GC	Cromatografia gasosa (do inglês Gas Chromatography)
HCl	Ácido clorídrico
HMF	hidroximetilfurfural
HPAE	Cromatografia líquida de troca iônca de alta eficiência (do inglês High-peformance anion-exchange)
HPLC	Cromatógrafia líquida de alta eficiência (do inglês High Performance Liquid Chromatography)
IR	Infravermelho (do inglês Infrared)
L	litro
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	miligrama
mL	mililitro
m/z	razão massa carga
nm	nanometro
PABA	Ácido p-aminobenzoico
PAD	Detecção por amperometria pulsada (do inglês Pulsed Amperometric Detection)
pH	logaritmo negativo da atividade de íons hidrogênio
RDS	Desvio padrão relativo (do inglês Relative Standard Deviation)
SD	Desvio padrão (do inglês Standard Deviation)
t_R	Tempo de retenção (min)
UV/Vis	Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 A cachaça no Brasil 18

1.2 Os analitos: Furfural e Hidroximetilfurfural 20

1.3 Espectroscopia de Reflectância Difusa (ERD) associada a *spot-test* 23

1.3.1 Reflectância 23

1.3.2 ERD associada a spot-test 25

1.4 Barreiras hidrofóbicas 26

1.5 Metodologias de *screening* 27

1.6 Química Verde: conceitos básicos 31

2 OBJETIVOS 34

3 PARTE EXPERIMENTAL 35

3.1 Material e Métodos 35

3.2 Equipamentos utilizados 35

3.3 Reagentes 36

3.4 Soluções utilizadas 36

3.5 Metodologias 37

3.5.1 Spot-test 37

3.5.2 Sistema de Screening 38

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 40

4.1 Testes preliminares 40

4.2 Otimização das condições experimentais 40

4.2.1 Planejamento fatorial *40*

4.2.2 Superfície de resposta *41*

4.2.3 Teste de estabilidade do produto formado *42*

4.2.4 Curva analítica *42*

4.2.5 Adição de padrão e recuperação *42*

4.2.6 Aplicação da metodologia proposta em amostras de cachaça *43*

4.2.7 Metodologia comparativa *43*

4.2.8 Confirmação da estrutura proposta para o produto *43*

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 44

5.1 Testes preliminares 44

5.1.1 Ordem de adição *45*

5.1.2 Determinação da porcentagem de etanol *46*

5.1.3 pH da solução de reagente *47*

5.1.4 Barreiras hidrofóbicas e volume de adição *47*

5.2 Comprovação da estrutura dos produtos formados 49

5.3 Otimização das condições experimentais 52

5.3.1 Planejamento fatorial *52*

5.3.2 Superfície de resposta *57*

5.3.3 Estabilidade do produto da reação *62*

5.4 Figuras de mérito 64

5.4.1 Curva analítica *65*

5.4.2 Limites de detecção e quantificação *69*

5.4.3 Repetibilidade *70*

5.5 Validação da metodologia proposta....71

5.5.1 Adição de padrão e recuperação *71*

5.5.2 Aplicação da metodologia proposta em amostras de cachaça *73*

5.5.3 Metodologia comparativa *76*

5.5.4 Comparação dos resultados obtidos *80*

6 CONCLUSÕES....84

7 PERSPECTIVAS FUTURAS 85

REFERÊNCIAS....86

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cachaça no Brasil

Cachaça é a denominação dada a aguardente de cana produzida no Brasil com graduação alcóolica entre 38-48%. Esta bebida é obtida através da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar; podendo ser considerada como não adoçada se forem adicionados até 6 gramas de sacarose a cada litro de bebida. Cachaças são consideradas adoçadas se forem adicionados de 6 a 30 gramas de sacarose a cada litro de bebida. Os termos “cachaça” e “cachaça do Brasil” são restritos aos produtores estabelecidos no país (BRASIL...,2005).

Antigamente, a cachaça era tida como uma bebida de baixo *status* cultural, sendo consumida somente pelas classes menos favorecidas da população. Durante o período do Brasil Colonial, teve sua produção proibida, uma vez que, após sua popularização, ocasionou a queda da venda da bagaceira, uma aguardente de origem portuguesa feita através da destilação do bagaço de cascas de uva. Por esse motivo, durante o século XVIII, a cachaça tornou-se símbolo da resistência contra o domínio português; até final do século XIX e início do século XX, volta a sofrer preconceito das classes mais altas da sociedade que buscavam uma identidade mais europeia. Somente na Semana de Arte Moderna de 1922, na qual se buscava retomar as raízes brasileiras a cachaça ganha espaço como ícone da cultura popular nacional (SAKAI, 2015).

Em 2014, a cachaça foi exportada para 66 países, gerando uma receita de mais de US$ 18,33 milhões, um aumento de 10% em relação ao ano anterior. Dentre os principais destinos da bebida, destacam-se Alemanha, com 15,75% da receita, Estados Unidos, com 13,73% e França, com 9,13%(INSTITUTO..., 2015). Anualmente, são produzidos cerca de 800 milhões de litros de cachaça, dos quais, 10,2 milhões são destinados à exportação. No país, os principais consumidores da bebida são os estados de São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Ceará, Bahia e Minas Gerais. (INSTITUTO..., 2015).

O órgão controlador deste tipo de produto no Brasil é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual estabelece uma série de parâmetros de qualidade para as cachaças, dentre eles (BRASIL, 2005):

- Acidez volátil, expressa em ácido acético com máximo de 150 mg/100 mL de

etanol anidro;

- Ésteres totais, expresso em acetato de etila com máximo de 200 mg/100 mL de etanol anidro;

- Aldeídos totais, expresso em acetaldeído com máximo de 30 mg/100 mL de etanol anidro;

- Furfural+Hidroximetilfurfural com máximo de 5 mg/100 mL de etanol anidro;

- Álcoois superiores, expresso pela soma do álcool n-propílico, álcool isobutílico e álcoois isoamílicos com máximo de 360 mg/100 mL de etanol anidro.

A produção da cachaça engloba em média as seguintes etapas (adaptado de SAKAI, 2015):

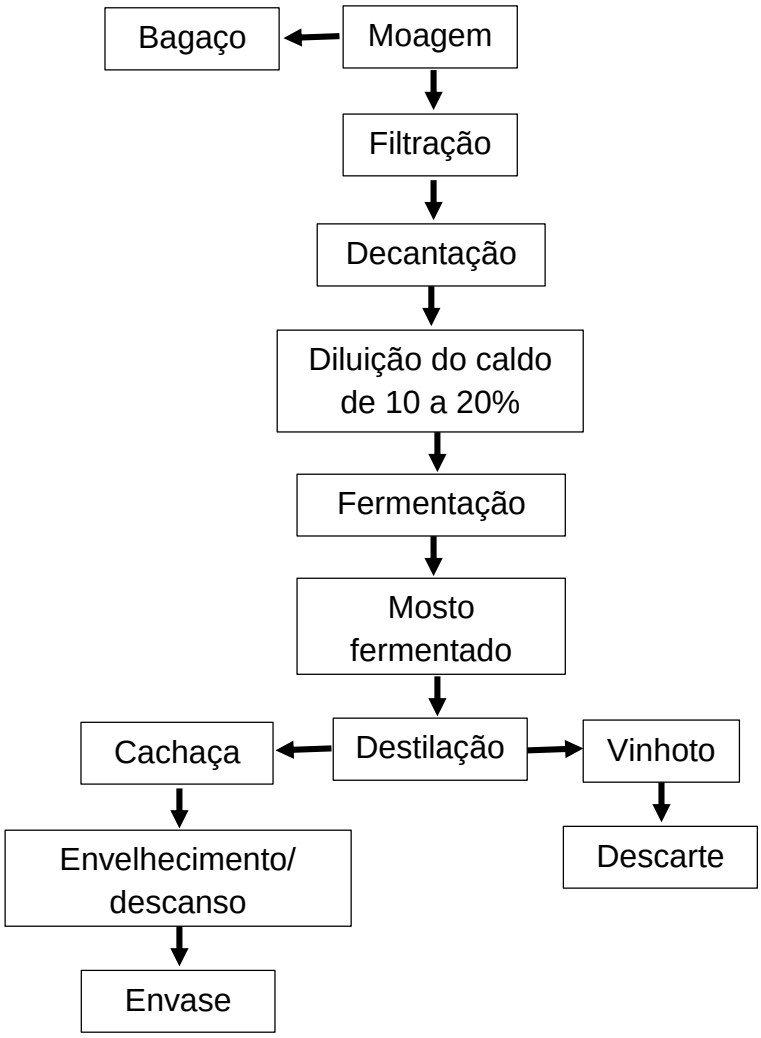

Figura 1 – Fluxograma das etapas de produção da cachaça
Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de SAKAI, 2015

Ao contrário da maioria dos contaminantes, não é somente durante a etapa de fermentação que se dá a formação de compostos indesejáveis como furfural (FUR) e hidroximetilfurfural (HMF). Ambos podem se originar no próprio caldo de cana-de-açúcar, caso a colheita seja antecedida da queima da folhagem, o que pode ocasionar a geração de açúcares livres (pentoses e hexoses) no caldo, cuja degradação acarreta na formação de FUR e HMF, sendo que a degradação das pentoses leva à formação do FUR, enquanto a degradação das hexoses leva à formação do HMF. Como já foi descrito na literatura, HMF e FUR são conhecidos por serem marcadores de processos térmicos, ou seja, quando determinado produto que contém açúcares passa por qualquer etapa de aquecimento, há um aumento na formação de HMF e FUR, entre outros compostos (MESÍAS-GARCÍA, 2010; CIESAROVÁ, 2009; RAJCHL, 2009; CATTANEO, 2015; AQUINO, 2006)

1.2 Os analitos: Furfural e Hidroximetilfurfural

Como já dito anteriormente, FUR e HMF (figura 2) são compostos indesejados em cachaças e, conforme estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL..., 2005) possuem limite de 5 mg da somatória dos dois compostos a cada 100 mL de etanol anidro.

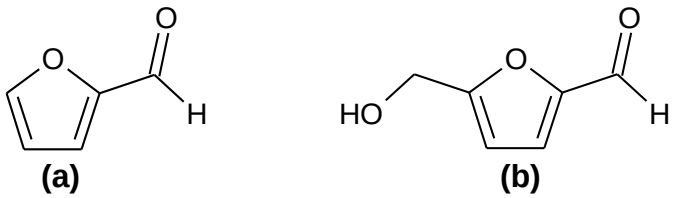

Figura 2 – Fórmula estrutural do **(a)** FUR **(b)** HMF
Fonte: elaborado pelo autor

A presença desses compostos é um fator negativo, pois confere ao produto características indesejadas como aroma penetrante e enjoativo (SOUZA, 2009; MAIA, 1994). Além disso, FUR e HMF possuem potencial mutagênico/carcinogênico devido à planaridade das estruturas das moléculas (figura 2), podendo haver interação entre o DNA celular, sem produção metabólica (KHAN, 1995; MAGA, 1979; CAPUANO, 2011, ABRAHAM, 2011; ARTS, 2011; GODFREY, 2010; JANZOWSKI, 2000; MATSUSHITA, 2012; ARRIBAS-LORENZO, 2010).

Atualmente, há diversas metodologias para determinação de FUR e HMF nos mais variados tipos de amostra. Entretanto, grande parte dos métodos empregados, faz uso de técnicas cromatográficas de análises, o que, embora seja eficiente na

determinação dos analitos, utiliza solventes orgânicos nocivos ao operador e ao meio ambiente, bem como a demanda de equipamentos caros e operadores especializados; sendo assim, na maioria dos casos, metodologias cromatográficas não condizem com os princípios da Química Verde (LENARDÃO, 2003; ANASTAS, 1998) que visam minimizar ou eliminar o uso de solventes tóxicos, bem como desenvolver metodologias mais simples e menos onerosas.

Na tabela 1, é possível visualizar uma comparação de várias metodologias para determinação de FUR e/ou HMF em diferentes tipos de matrizes.

Tabela 1 – Comparação de diferentes métodos de análise de FUR e/ou HMF em matrizes diversas

Técnica	Faixa linear (FUR)	Faixa linear (HMF)	Comentários	Referência
HPLC com detecção no UV	Não é analisado	0,09 – 5,94 mg L^{-1}	Aplicação em mel e matrizes com açúcar. Na fase móvel se utiliza solução aquosa de H_2SO_4 como solvente	RISNER, 2006
GC-FID	-	Não é analisado	Determinação de FUR em sulfite. Extração com $CHCl_3$	HOFFMAN JR, 1980
HPLC-UV, GC-FID	Não é analisado	10 – 500 mg L^{-1}	Aplicação em pães e outros produtos do gênero. Fase móvel utiliza ACN	JIMÉNEZ, 2000
HPAE-PAD	Não é analisado	0,1 - 50 mg L^{-1}	Aplicação em matrizes de açúcar e biomassa. Geração online de solução KOH	BASUMALLICK, 2013
HPLC-DAD, Espectrofotométrico	Não é analisado	-	Amostras de mel: na análise por HPLC usa-se MeOH. Nas análises espectrofotométricas usa-se bissulfito, ácido barbitúrico e p-toluidina.	ZAPALLÁ, 2005
HPLC com detecção eletroquímica	$8,0 \times 10^{-7}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}		Análise em bagaço de cana de açúcar. Desenvolvimento de eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas de Ni	SILVA, 2013
Colorimétrico	-	-	Baseia-se na reação do furfural com o íon anilínio, proveniente do acetato de anilínio, formando o furfulidenanelina, que é quantificada por colorimetria em 520 nm.	BRASIL, 2014
HPLC – DAD	-	-	Análise de HMF e FUR em amostras de bebidas alcóolicas com ACN na FM. Amostras diluídas em ACN.	ALCÁZAR, 2006
HPLC com detecção no UV	0,5 – 504,4 mg kg^{-1}		Análise de HMF e FUR em amostras de biscoitos com nova metodologia para extração dos analitos usando TCA	AMEUR, 2006
HPLC com detecção por UV e IR	Não é analisado	1–128 g L^{-1}	Determinação de HMF em amostras de cerveja e solução de ACN e H_2SO_4 como FM	CASTELLARI, 2001

Fonte: elaborado pelo autor[1]

[1] As tabelas de 1 a 33 foram elaboradas pelo autor

Sendo assim, torna-se necessário uma metodologia para análise de FUR e HMF que seja ambientalmente mais amigável que os métodos cromatográficos geralmente empregados, dessa maneira, têm-se como alternativa a utilização da Espectroscopia de Reflectância Difusa, técnica a qual será discutida a seguir.

1.3 Espectroscopia de Reflectância Difusa (ERD) associada a *spot-test*

1.3.1 Reflectância

O fenômeno da reflectância se dá quando a luz incide num suporte sólido, a partir deste momento ocorrem dois processos distintos, um deles é a reflexão especular que ocorre na interface de um meio, sem que haja transmissão através dele; outro processo é a reflexão difusa que se dá quando ocorre penetração da radiação incidente na superfície do material e, em seguida, reaparece na superfície do meio depois de uma absorção parcial e espalhamento múltiplo em camadas mais internas da superfície do material de suporte (NARAYANASWAMY, 1993). Esses dois processos são complementares, entretanto a reflexão especular não possui importância significativa em análises colorimétricas, podendo ser minimizada, ou até mesmo eliminada através da preparação da amostra, ou utilizando se uma esfera de integração, ou mesmo realizando as leituras do sinal analítico num ângulo de 45º (LUIZ, 2015).

A reflectância difusa ocorre em superfícies foscas ou opacas por causa das reflexões múltiplas a partir da superfície das partículas formadoras do meio. Como dito anteriormente, este processo é devido à penetração da radiação no substrato sólido sendo que uma porcentagem desta radiação retorna à superfície, ocorrendo concomitantemente a absorção parcial pelas partículas ou fibras que constituem o substrato sólido. Como há inúmeras superfícies orientadas de modo aleatório, a radiação é refletida em todas as direções, de maneira que a intensidade independe do ângulo de observação (ou do ângulo no qual é feita a leitura do sinal analítico) (TUBINO, 1997; NARAYANASWAMY, 1993; GHAUCH, 1999; WENDLANDT, 1966).

Uma série de modelos foram elaborados na tentativa de descrever a intensidade da radiação refletida de maneira difusa de modo quantitativo. O modelo mais utilizado é o que pertence à teoria de Kubelka-Munk, que relaciona a concentração da amostra com reflectância por meio da relação entre o coeficiente de absorção molar do analito (k), o coeficiente de dispersão ou espalhamento (s) e o poder de reflectância em um meio semi-infinito, ou seja, num meio infinitamente fino

(R_∞):

$$f(R_\infty) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2\,R_\infty} = \frac{k}{s}$$

Equação 1

Na qual R_∞ é a razão entre a intensidade refletida pela amostra e a de um padrão que não absorva, tal qual cloreto de potássio (KCl) finamente pulverizado.

Com relação às amostras diluídas, a absorção molar dos analitos (k) estão relacionadas às absortividades molares (ε) e também à concentração de analito no meio (C). Esta relação pode ser expressa através da equação 2 a seguir:

$$k = 2{,}303\varepsilon C$$

Equação 2

Em medidas de reflectância, os sinais lidos são da radiação transmitida refletida, ou somente reflectância, representada por T_R, que é análoga da transmitância (T), consequentemente, a "absorbância reflectiva" obtida a partir de T_R, também é análoga da absorbância (A), e é representada por A_R. Sendo assim, tem-se que:

$$\mathbf{A_R = -\log T_R}$$

Equação 3

Na qual:

$$T_R = {}^{I}\!/_{I_0}$$

Equação 4

Sendo que I_0 representa a intensidade da radiação incidente e I representa a intensidade da radiação refletida pelo meio. Dessa forma, T_R é um número entre zero e um. Assim sendo, o tratamento dos dados é semelhante àquele onde se trabalha com a absorbância e, na maioria dos casos, os gráficos traçados são de A_R em função da concentração.

Entretanto, há outros tipos de representação gráficas de A_R, tais quais como (GHAUCH, 2000): log A_R em função de C^2; A_R em função de C^3; A_R em função de $[C/(1\text{-}C)^2]$; entre outros.

Na figura 3, a radiação incidente e a reflexão especular estão representadas

pelos traços em vermelho, enquanto a reflexão difusa é representada pelos traços azuis; nota-se que, antes de emergir para superfície a reflexão difusa penetra no material de suporte e é parcialmente dispersa nele (LUIZ, 2015). No caso, o material utilizado como suporte sólido é o papel de filtro qualitativo.

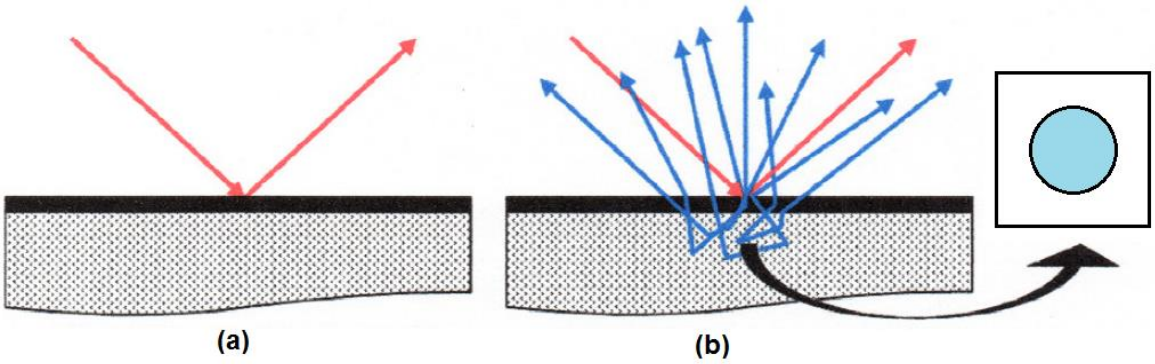

Figura 3 – Esquema representando **(a)** reflexão especular **(b)** reflexão difusa
Fonte: adaptado de LUIZ, 2015.

As medidas de reflectância difusa podem ser realizadas *in situ* utilizando equipamentos portáteis e de baixo custo relativo (VERAS, 2009; LUIZ, 2012, 2013), quando comparados aos sistemas cromatográficos amplamente utilizados hoje em dia.

1.3.2 ERD associada a spot-test

Na ERD associada a *spot-test* há o uso de quantidades mínimas de reagentes e solventes, minimizando consideravelmente as quantidades de resíduos gerados. Além do mais, há diminuição de custos, atendendo às disposições propostas pela Química Verde, pois o procedimento de análise é extremamente rápido, simples e prático (LUIZ, 2013). Nessa técnica, a amostra adsorvida é diretamente medida na superfície do suporte sólido, o que evita a perda do analito durante a eluição do material adsorvente. Também, a ERD torna o procedimento analítico mais rápido e barato, bem como podendo ser facilmente incorporada a procedimentos analíticos ambientalmente amigáveis (ZANJANCHI, 2006; FERNANDES, R., 2004). Ou seja, a ERD associada a *spot-test* utilizando papel como suporte sólido é uma técnica extremamente simples, de fácil manuseio e incorporação à metodologia ambientalmente amigável; também é consideravelmente mais barata que as

metodologias cromatográficas usualmente utilizadas.

1.4 Barreiras hidrofóbicas

Uma opção prática para aumentar a sensibilidade da ERD associada ao *spot-test* é o uso de barreiras hidrofóbicas impregnadas no papel usado como suporte sólido. Essas barreiras impedem a eluição do analito para além da área delimitada, aumentando sua concentração e, consequentemente, aumentando também a intensidade do sinal analítico.

O primeiro relato do uso de barreiras hidrofóbicas na literatura foi por Yagoda (1937) em 1937 para análise de íons metálicos. Desde então, uma série de trabalhos emprega o uso de barreiras hidrofóbicas no desenvolvimento de metodologias analíticas extremamente baratas e portáteis (ADKINS, 2015; CATE, 2015; DUNGCHAI, 2010; CARRILHO, 2009), tendo destaque o emprego de tais métodos em análises de amostras biológicas (DOU, 2015; MARTINEZ, 2010; GARCIA, 2014; SONGJAROEN, 2012).

Atualmente, uma “evolução” das barreiras hidrofóbicas que tem obtido destaque no meio acadêmico, são os dispositivos analíticos microfluídicos em papel (µPAD), que usam o mesmo conceito das barreiras hidrofóbicas em arranjos mais elaborados (GARCIA, 2014; LANKELMA, 2012). Com a intenção de melhorar a sensibilidade da metodologia analítica a ser desenvolvida, o papel de filtro utilizado como *spot-test* foi impregnado com barreiras de cera hidrofóbicas, que, resumidamente, trata-se de imprimir as barreiras no papel de filtro e aquecê-las para a formação das barreiras hidrofóbicas.

A literatura descreve várias maneiras de impregnar o papel com barreiras hidrofóbicas (CARRILHO, 2009; CATE, 2015), sendo uma delas a utilização de impressora de cera. Incialmente, o *design* das barreiras hidrofóbicas é feito com auxílio de um *software* gráfico, como por exemplo, CorelDRAW ou similar. Então, por meio de uma impressora com tinta à base cera, as barreiras são impressas no papel de filtro qualitativo a ser usado como suporte sólido. A impressora deposita a tinta à base de cera no papel e, após passar por um processo de aquecimento, feito com auxílio de chapas aquecedoras ou mesmo de estufas, a cera depositada na superfície do suporte sólido penetra nos poros do papel formando as barreiras hidrofóbicas. Este procedimento é exemplificado no esquema a seguir na figura 4.

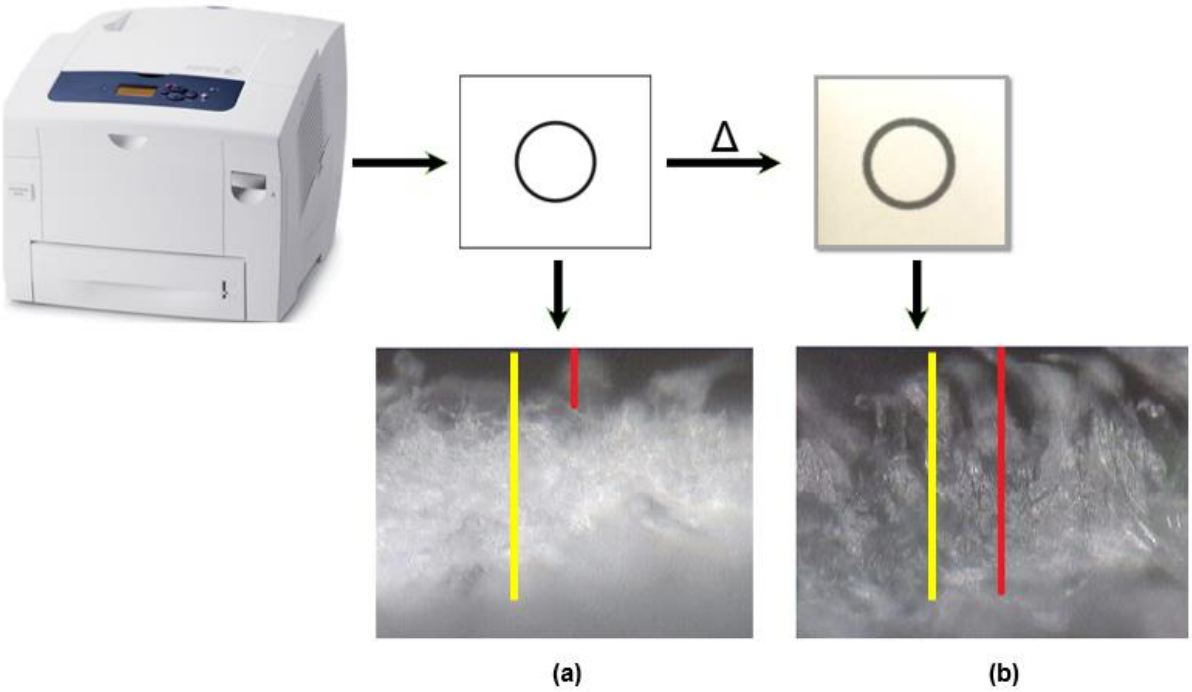

Figura 4 – Esquema representativo da impregnação das barreiras hidrofóbicas no papel de filtro. Corte lateral do papel; em **(a)** tem-se a camada de cera depositada sobre o papel, já em **(b)** nota-se que a cera penetrou nos poros do papel depois do aquecimento. O traço amarelo representa a espessura do papel, enquanto o vermelho representa a espessura da camada de cera
Fonte: elaborado pelo autor

Como é possível observar na figura 4, a cera penetra nos poros do papel, o que irá impedir que as soluções aplicadas no interior da área delimitada eluam para além das barreiras formadas. Sendo assim, os analitos terão sua concentração aumentada e, consequentemente, também o sinal analítico gerado.

As barreiras hidrofóbicas aumentam consideravelmente a sensibilidade da metodologia analítica sem que seja necessário aquecimento ou mesmo o uso de ácidos fortes e corrosivos durante a execução dos experimentos, sendo condizente com os princípios da Química Verde.

1.5 Metodologias de *screening*

A espectroscopia de reflectância difusa associada a *spot test* pode ser utilizada como uma metodologia de “screening”. Metodologias de *screening* permitem acesso rápido aos resultados e sua característica mais relevante é a resposta binária do tipo SIM/NÃO para certo analito. O resultado encontrado é capaz de afirmar se o analito presente está abaixo ou acima de um limite pré-estabelecido (OLIVAS, 2004; CATELANI, 2014). O papel do sistema de screening na classificação de um conjunto

de amostras é ilustrado na figura 5.

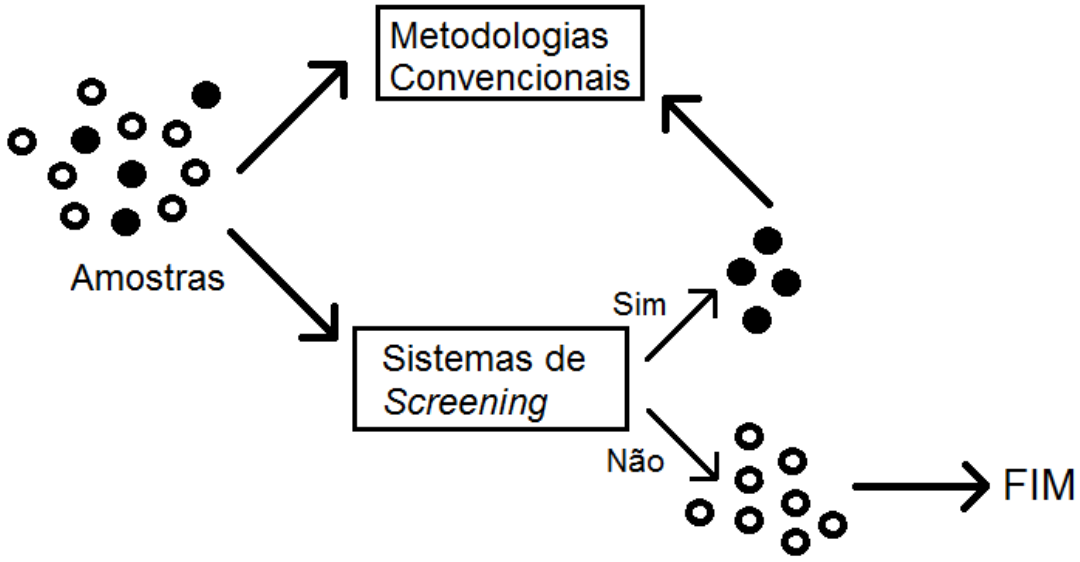

Figura 5 – Esquema representativo das metodologias de *screening*
Fonte: adaptado de Valcárcel, 1999

Na figura 5 apresentada anteriormente nota-se pontos em destaque representam as amostras que contêm os analitos acima do limite pré-estabelecido. Sendo assim, após a análise dos mesmo pela metodologia de *screening,* essas amostras são então analisadas por metodologia convencionais; dessa forma, as metodologias de *screening* funcionam tal qual um “filtro”, no qual as amostras que obtêm resposta do tipo “SIM” são analisadas por método consagrados, enquanto as amostras que obtêm resposta do tipo “NÃO” não passam por essas metodologias. Como pode ser observado na mesma figura todas as amostras foram submetidas às metodologias convencionais, isso é feito para confirmar as respostas obtidas pelas metodologias de *screening*; entretanto, submeter todas as amostras às metodologias convencionais não é necessariamente obrigatório, e, na maior parte dos casos esse procedimento é realizado para haver maior número de informações analíticas (VALCÁRCEL, 1999).

De acordo com Peña (2002), as metodologias de *screening* são destinadas à averiguação preliminar e são apropriados para sanar a suspeita da ausência ou presença de certo analito em determinada amostra, levando em consideração um limite pré-estabelecido. Caso o resultado encontrado esteja acima desse limite considera-se que o analito esteja presente, correspondente ao SIM; entretanto se o analito estiver abaixo do limite, correspondente ao NÃO, considera-se o analito como

ausente.

Uma das principais vantagens da técnica de *screening* é a rapidez na análise dos resultados, caso a resposta encontrada seja NÃO, ou seja, se o analito está abaixo do limite pré-estabelecido, a análise se encerra; somente quando a resposta para metodologia de *screening* é SIM, quando o analito está acima do limite pré-estabelecido, confronta-se o resultado com uma metodologia de análise comparativa. Com isso há economia de reagentes e no custo de análise, bem como uma minimização dos resíduos gerados; também pode ser realizado um maior número de análises, uma vez que nem todas as amostras deverão ser confrontadas com a metodologia comparativa, o que, por sua vez, torna a análise mais rápida (GONZÁLEZ, 2011).

Em alguns casos, a resposta binária qualitativa fornecida por um sistema de *screening* pode também apresentar informações quantitativas ou semi-quantitativas. Nesses casos, além de indicar em quais amostras o analito está presente, o sistema de *screening* também pode indicar a concentração do mesmo. Entretanto, nestes casos algumas informações quantitativas devem ser levadas em conta: o limite de detecção da técnica utilizada; o limite imposto pelo cliente ou pela legislação em vigor; o nível de concentração de corte adotado pelo analista; as incertezas nas quantificações prévias (VALCÁRCEL, 1999).

Metodologias de *screening* das quais se pode extrair informações quantitativas são descritas na literatura, sendo aplicadas aos mais diferentes tipos de matrizes (JADSHAV, 2015; MANGANIELLO, 2002). Essas metodologias possuem as mesmas vantagens de metodologias de *screening* convencionais, diferindo somente no fato de que aqui os analitos são quantificados e não somente apontados como estado acima ou abaixo do limite determinado.

Sistemas de *screening* podem ser classificados de diversas maneiras; entretanto, como uma das finalidades da utilização de sistemas de *screening* é a minimização ou a eliminação de etapas de pré-tratamento de amostras, os sistemas de *screening* podem ser divididos quanto ao tipo de tratamento realizado na amostra. No chamado “*screening* direto” não há qualquer tipo de pré-tratamento nas alíquotas retiradas da amostra antes de serem submetidas às metodologias de *screening*, caso a resposta de uma alíquota seja positiva, esta é submetida a processos analíticos convencionais a fim de se obter a confirmação da resposta binária e/ou obter informação quantitativas a respeito desta alíquota. Metodologias de “*screening* direto”

geralmente possuem respostas qualitativas, através da mudança de coloração, ou semi-quantitativas, por meio da comparação do resultado obtido com uma cartela de cores, por exemplo; neste caso, a instrumentação utilizada na determinação dos analitos é simples, como um espectrofotômetro, ou um refratômetro. Um esquema representativo deste tipo de *screening* pode ser observado na figura 6 a seguir.

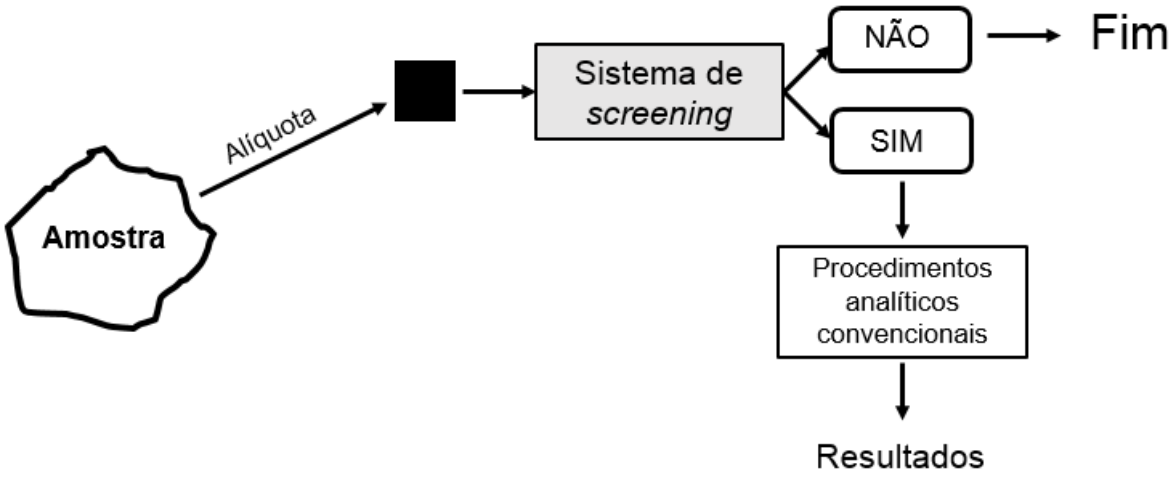

Figura 6 – Esquema de *screening* direto
Fonte: adaptado de Valcárcel, 1999

Um segundo tipo de classificação de *screening* quanto ao tipo de pré-tratamento das alíquotas retiradas da amostra é aquele no qual essas alíquotas passam por um pré-tratamento simples antes da análise pela metodologia de *screening,* o qual também deve ser rápido e, se possível, automatizado; então a sequência analítica se dá tal qual no primeiro caso após o pré-tratamento. Enquanto isso, uma segunda alíquota é retirada da amostra e submetida aos processos analíticos convencionais sem o tratamento prévio para que os resultados finais sejam comparados. Este tipo de sistema de *screening* é utilizado para que não seja necessário um processo analítico convencional ao longo de toda determinação do(s) analito(s) de interesse, sendo usado somente para confirmação das respostas obtidas através da metodologia de *screening.* Um esquema representativo pode ser visualizado a seguir na figura 7.

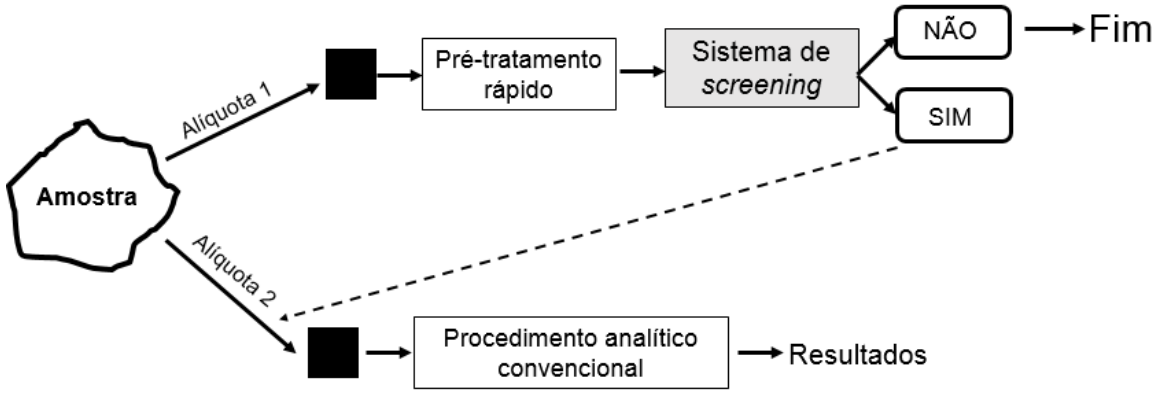

Figura 7 – Esquema de *screening* com pré-tratamento rápido
Fonte: adaptado de Valcárcel, 1999.

O terceiro e último tipo de classificação de *screening* quanto ao pré-tratamento de amostras é aquele no qual é necessário realizar um pré-tratamento completo em todas as alíquotas retiradas das amostras a serem analisadas. Após o tratamento completo das alíquotas, a análise segue de maneira similar ao segundo tipo de *screening* relatado. Geralmente é utilizado quando se tratam de amostras mais complexas, como alimentos, por exemplo. O uso deste tipo de metodologia de *screening* se justifica somente quando o equipamento utilizado nas metodologias de análise convencionais possui alto custo de manutenção. Um esquema relativo a este tipo de metodologia pode ser visualizado na figura 8 a seguir.

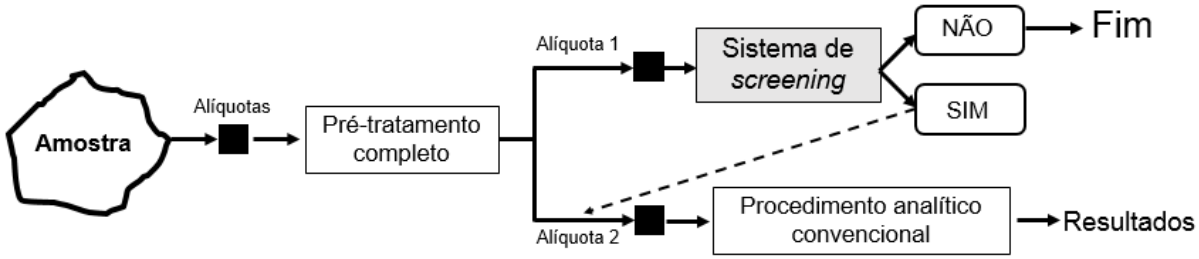

Figura 8 – Esquema de *screening* com pré-tratamento completo
Fonte: adaptado de Valcárcel, 1999.

1.6 Química Verde: conceitos básicos

Nos últimos anos, há uma maior preocupação com a saúde e o bem-estar dos seres vivos e também com o meio ambiente. Tem-se buscado alternativas para contornar os danos causados pelos seres humanos à natureza e aos seres vivos, foi nesse ínterim que surgia a Química Verde e, basicamente, se resume nos famosos

12 princípios (ANASTAS, 2002, 1998):

1. Prevenção: Evitando a produção de resíduos, não há necessidade de trata-los depois da sua geração;
2. Economia de átomos: Os métodos sintéticos devem ser desenvolvidos para maximizar a incorporação de átomos dos reagentes nos produtos finais desejados;
3. Síntese de compostos de menor toxicidade: Sempre que possível, a síntese de produtos químicos deve usar e gerar substância que possuam pouco ou, preferencialmente, nenhuma toxicidade à saúde humana ao meio ambiente;
4. Desenho de produtos seguros: Os produtos químicos a serem obtidos deve ser pouco nocivos e também atender às necessidades para que foram fabricados;
5. Solventes e auxiliares mais seguros: Evitar ao máximo o uso de auxiliares (solventes, secantes, agentes de separação, entre outros). Quando estes não forem indispensáveis, devem, portanto, ser não tóxicos;
6. Busca pela eficiência energética: Deve-se minimizar o uso da energia em processos químicos, dado seu impacto ambiental e econômico. Sempre que possível, os processos químicos devem ser feitos à temperatura e pressão ambiente;
7. Uso de fontes renováveis de matéria-prima: Utilizar preferencialmente recursos advindos de fontes renováveis do que aqueles provenientes de fontes não renováveis;
8. Evitar a formação de derivados: A derivatização desnecessária (proteção/desproteção, uso de grupos bloqueadores, entre outros) deve ser minimizada ou, melhor, evitada; uma vez que essas etapas fazem uso de reagentes a mais, podendo gerar resíduos;
9. Catálise: A aplicação de catalisadores para aumentar a velocidade dos processos químicos;
10. Desenho para a degradação: Os produtos químicos formados devem ser esquematizados de tal maneira que, ao término de sua função, se fragmentem em produtos de degradação atóxicos e não prossigam no meio ambiente;
11. Análise em tempo real para a prevenção da poluição: Desenvolvimento de metodologia que viabilizem o monitoramento e controle do processo, em tem real, antes mesmo da formação de qualquer substância nociva;
12. Química intrinsicamente segura para a prevenção de acidentes: As substâncias e sua própria utilização deve ser escolhida de maneira a minimizar o risco de qualquer incidente químico.

Resumidamente, a Química Verde busca formas de análise que não prejudiquem aqueles que realizam as operações analíticas bem como o ambiente que estes habitam.

A aplicação da Química Verde na prática possibilitou o avanço de diversas

áreas que, desde a Catálise (CLARK, 2001), Química Analítica (ARMENTA, 2015) ou mesmo a Síntese Orgânica (KURUPPATHPARAMBIL, 2015), buscam melhorias sem comprometer a saúde do operador e o desenvolvimento sustentável. O papel Química Verde não reside somente nas áreas aqui citadas, mas deve ser incorporado na Química de uma maneira geral, desde o ensino até sua aplicação em indústrias e, principalmente, na pesquisa (ANASTAS, 2002).

Nesse contexto, o presente trabalho visa aplicar a Química Verde no desenvolvimento de uma nova metodologia de *screening* para determinação de FUR e HMF em amostras de cachaça utilizando a espectroscopia de reflectância difusa associada ao *spot-test* em papel qualitativo delimitado com barreiras hidrofóbicas. Nesta metodologia, pretende-se dispensar o uso de solventes orgânicos nocivos, bem como eliminar a utilização de equipamentos de alto custo agregado, simplificando consideravelmente a análise dos analitos propostos.

6 CONCLUSÕES

Ao término dos experimentos, é possível concluir que foi desenvolvido um novo método para determinação de furfural e hidroximetilfurfural em amostras de cachaça utilizando metodologias de *screening* quantitativo e *spot-test* com papel de filtro como suporte sólido delimitado com barreiras hidrofóbicas. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso em amostras de cachaça.

As barreiras hidrofóbicas impregnadas na superfície do papel de filtro aumentaram significativamente a sensibilidade do método por concentrar as manchas, tornando-as mais intensas e homogêneas.

Os testes de adição de padrão e recuperação mostraram que a matriz não influencia de maneira significativa na determinação dos analitos.

Os resultados obtidos pela metodologia proposta foram comparados com os resultados obtidos através de uma metodologia comparativa já descrita na literatura, o teste estatístico realizado permite afirmar que os resultados são estatisticamente equivalentes.

As estruturas propostas para os produtos das reações dos dois analitos com ácido p-aminobenzoico e ácido barbitúrico foram confirmadas através de estudos de espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, K. et al. Toxicity and risk assessment of 5-hydroxymethylfurfural in food. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 667-678, 2011.

ADKINS, J.; BOEHLE, K.; HENRY, C. Electrochemical paper-based microfluidic devices. **Electrophoresis**, v. 36, p. 1811-1824, 2015.

ALCÁZAR, A. et al. HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyÞ in alcoholic beverages. **Microchemical Journal**, v. 82, p. 22-28, 2006.

AMEUR, L. A.; TRYSTRAM, G.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the backing process: validation of an extraction method. **Food Chemistry**, v. 98, p. 790-796, 2006.

ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status and future challengers of green chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, p. 686-694, 2002.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry**: theory and pratice. New York: Oxford University Press, 1998. 135 p.

AQUINO, F. W. B. de et al. Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, v. 98, p. 569-574, 2006.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. de la. The role of green extraction techniques in green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2-8, 2015.

ARRIBAS-LORENZO, G.; MORALES, F. J. Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 644-649, 2010.

ARTS, J. H. E. et al. Subacute (28-day) toxicity of furfural in Fischer 344 rats: a comparison of the oral and inhalation route. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1389-1399, 2004.

BASUMALLICK, L.; ROHRER, J. **Determination of hydroxymethylfurfural in honey in bimass**. Sunnyvale: Thermo Fischer Scientific, 2013. Application note 270. Disponível em: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/109807-AN270-IC-HMF-Honey-Biomass-AN70488_E.pdf>. Acesso em: 15 set 2015.

BENEDETTI, L. P. dos S. et al. A digital image-based method employing a spot test for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, v. 7, p. 4138-4144, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 13**. Aprova regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para a cachaça. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/$FILE/IN%20N%C2%BA%2013-2005.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Coordenação Geral de Apoio Laboratorial. **Manual de métodos de análise de bebidas e vinagre**. Destilados, método 22: Furfural (colorimétrico). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/image/mop/4.rar>. Acesso em: 05 maio 2014.

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

CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 7091-7095, 2009.

CASTELLARI, M. et al. Determination of carboxylic acids, carbohydrates, glycerol, ethanol, and 5-HMF in beer by high-performance liquid chromatography and UV–refractive index double detection. **Journal of Chromatograph Science**, v. 39, p. 235-238, Jan. 2001.

CASTOLDI, K. **Desenvolvimento de um método limpo para análise de 5-hidroximetil-2-furfuraldeído em mel**. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CATE, D. M. et al. Recent developments in paper-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 19-41, 2015.

CATELANI, T. A. et al. A simple and rapid screening method for sulfonamides in honey using a flow injection system coupled to a liquid waveguide capillary cell. **Talanta**, v. 121, p. 281-287, 2014.

CATTANEO, S. et al. Heat demage and in vitro digestibility of puffed wheat kernels. **Food Chemistry**, v. 188, p. 286-293, 2015.

CIESAROVÁ, Z. et al. Effect of heat treatment and dough formulation on the formation of Maillard reaction products in fine bakery products – benefits and weak points. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 48, n. 1, p. 20-30, Mar. 2009.

CLARCK, J. H. Catalysis for green chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 103-111, 2001.

DOU, M. et al. Low-cost bioanalysis on paper-based and its hybrid microfluidic platforms. **Talanta**, v. 145, p. 43-54, Dec. 2015.

DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. C. Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 227-233, 2010.

FEIGL, F. Identification of individual organic compounds. In: _____. **Spot test in organic analysis**. 7th ed. Amsterdam: Elsevier, 1966. Chap. 5, p. 401-566.

FERNANDES, F. C. B. Screening and determination of sulphonamide residues in bovine milk samples using a flow injection system. **Food Chemistry**, v. 166, p. 309-315, 2015.

FERNANDES, R. B. A. et al. Quantificação de óxidos de ferro de latossolos brasileiros por espectroscopia de refletância difusa. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 245-257, 2004.

GARCIA, P. de T. et al. A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. **RSC Advances**, v. 4, p. 37637-37644, 2014.

GHAUCH, A. et al. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. **Talanta**, v. 48, p. 385-392, 1999.

GHAUCH, A. et al. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. **Chemosphere**, v. 40, p. 1327-1333, 2000.

GODFREY, V. B. et al. Distribution and metabolism of (5-hydroxymethyl)furfural in male F344 rats and B6C3F1 mice after oral administration. **Journal of Toxicology and Environmental Health**: Part A, v. 57, n. 3, p. 199-210, 2010.

GONZÁLEZ, R. R. et al. Food contaminant analysis at high-resolution mass spectrometry: application for the determination of veterinary drugs in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 9353-9365, 2011.

HOFFMAN, H. T. Jr. Determination of furfural in spent sulfite liquor by gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 194, p. 228-233, 1980.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC Magazine**, v. 21 p. 1-17, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE CACHAÇA. **Mercado externo**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-externo>. Acesso em: 11 ago. 2015.

JADSHAV, M. R. et al. Quantitative screening of agrochemical residues in fruits and vegetables by buffered ethyl acetate extraction and LC-MS/MS analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 4449-4456, 2015.

JANZOWSKI, C. et al. 5-hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-demaging potential and reactivity towards cellular glutathione. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 801-809, 2000.

JEFFREY, G. H. et al. **Vogel's textbook of quantitative chemical analysis**. 5th ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1989. 854 p.

JIMÉNEZ, A. R.; VILLANOVA, B. G.; HERNÁNDEZ, E. G. Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of bakery products. **Food Research International**, v. 33, p. 833-838, 2000.

JUNGREIS, E. Application of spot-tests in clinical analysis. In: _____ **Spot test analysis**: clinical, environmental, forensic, and geochemical applications. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, c1997. p. 15-78. (Chemical analysis, v. 141).

KHAN, Q. A.; SHAMSI, F. A.; HADI, S. M. Mutagenicity of furfural in plasmid DNA. **Cancer Letters**, v. 89, p. 95-99, 1995.

KURUPPATHPARAMBIL, R. R. et al. A room temperature synthesizable and environmental friendly heterogeneous ZIF-67 catalyst for the solvent less and co-catalyst free synthesis of cyclic carbonates. **Applied Catalysis B**: Environmental, v. 182, p. 562-569, 2016.

LANKELMA, J. et al. Peper-based analytical device for electrochemical flow-injection analysis of glucose in urine. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 4174-4152, 2012.

LENARDÃO, E. J. et al. "Green Chemistry" – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

LUIZ, V. H. M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of nitrite in meat products and water using dapsone with combined spot test/diffuse reflectance on filter paper. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2546-2551, Oct. 2012.

LUIZ, V. H. M; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Rapid determination of furosemide by combined spot test/diffuse reflectance spectroscopy to detect doping in sport. **Microchemical Journal**, v. 109 p. 68-72, 2013.

LUIZ, V. H. M. et al. Rapid determination of lead in progressive hair dye lotion by spot test/diffuse reflectance spectroscopy with a paper platform. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2137-2143, 2015.

MAGA, J. A.; KATZ, I. Furans in food. **Critical Rewies in Food Science and Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 355-400, 1979.

MAIA, A. B. R. Componentes secundários da aguardente. **STAB**: Áçúcar, Álcool e Subprodutos, v. 12, n. 6, p. 29-34. 1994.

MANGANIELLO, L.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. A method for screening total mercury in water using a flow injection system with piezoeletric detection. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 921-925, 2002.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 3-10, 2010.

MATSUSHITA, K. et al. Reporter gene mutation in the liver of *gpt* delta mice treated with 5-(hydroxymethyl)-2-furfural, a contaminant of various foods. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 37, n. 5, p. 1077-1082, 2012.

MESÍAS-GARCÍA, M.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Determination of furan precursors and some thermal demage markers in baby foods: ascorbic acid, dehydroascorbic acid, hydroxymethylfurfural and furfural. **Jounal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6027-6032, 2010.

NARAYANASWAMY, R. Optical chemical sensors: transduction and signal processing. **Analyst**, v. 118, p. 317-322, Apr. 1993.

OLIVAS, R. M. Screening analysis: an overview of methods apllied to environmental, clinical and food analyses. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 203-216, 2004.

PEÑA, R. et al. Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. **Journal of Chromatograph A**, v. 967, p. 303-314, 2002.

RAJCHL, A. et. al. Evaluation of shelf life and heat treatment of tomato products. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, p. 130-133, 2009.

RISNER, C. H.; KISER, M. J.; DUBE, M. F. An aqueouse high-performance liquid chromatograph procedure for the determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey and other sugar-containing materials. **Food Chemistry and Technology**, v. 71, n. 3, p. 179-184, 2006.

SAKAI, R. H. Cachaça. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html>. Acesso em: 11 ago. 2015.

SILVA, J. L. **Detecção eletroquímica de furfural e hidroximetilfurfural em bagaço de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

SONGJAROEN, T. et al. Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. **Lab on a Chip**, v. 12, p. 3392-3398, 2012.

SOUZA, L. M. de et al. Teores de compostos orgânicos voláteis em cachaças produzidas na Região Norte Fluminense – Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2304-2309, 2009.

THOMSON, M.; ELLISON, S. T. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TININIS, A. G. et al. Rapid spot test analysis for the detection of urotropine in pharmaceutical preparation. **Analytical Letters**, v. 33, p. 2901-2912, 2000.

TUBINO, M.; ROSSI, A. M.; MAGALHÃES, M. A. de. Quantitative spot test of Fe(III), Cr (IV), Ni(II) by reflectance measurements. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.

VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLENO, M. Sample screening systems in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 685-694, 1999.

VERAS, G. et al. A portable, inexpensive and microcontrolled spectrophotometer based on white LED as light source and CD media as diffraction grid. **Talanta**, v. 77, p. 1155-1159, 2009.

WENDLANDT, W. W.; HECHT, H. G. **Reflectance spectroscopy**. New York: Interscience, 1966. 298 p.

WINKLER, O. Beitrag zum nachweis und zur bestimmung von oxymethylfurfurol in honig und kunsthonig. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 102, n. 3, p. 161-167, 1955.

YAGODA, H. Applications of confined spot tests in analytical chemistry. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 79-82, Feb. 1937.

ZANJANCHI, M. A.; NOEI, H.; MOGHIMI, M. Rapid determination of aluminum by UV-vis diffuse reflectance spectroscopy with application of suitable adsorbents. **Talanta**, v. 70, p. 933-939, 2006.

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