

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

M637s Milani, Maria Izabel
Sistema de *screening* 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.

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



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



Prof.^a Dr.^a 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 alcoólico 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, requeem 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 $7,70 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o furfural e de $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 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 analytes are chromatographic techniques that, besides the high cost of the equipments 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 Student'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 <i>screening</i>	28
Figura 6 – Esquema de <i>screening</i> direto.....	30
Figura 7 – Esquema de <i>screening</i> com pré-tratamento rápido	31
Figura 8 – Esquema de <i>screening</i> com pré-tratamento completo.....	31
Figura 9 – Procedimento para reação no <i>spot-test</i>	38
Figura 10 – Suporte utilizado para aplicação de <i>spot-test</i>	38
Figura 11 – Esquema representativo de metodologias de <i>screening</i> associadas à metodologias de <i>spot-test</i>	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
$^{\circ}\text{C}$	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 iônica de alta eficiência (do inglês High-performance anion-exchange)
HPLC	Cromatografia 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	Deteção 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 caçaça no Brasil	18
1.2	Os analitos: Furfural e Hidroximetilfurfural	20
1.3	Espectroscopia de Reflectância Difusa (ERD) associada a <i>spot-test</i>	23
1.3.1	<i>Reflectância</i>	23
1.3.2	<i>ERD associada a spot-test</i>	25
1.4	Barreiras hidrofóbicas	26
1.5	Metodologias de <i>screening</i>	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	<i>Spot-test</i>	37
3.5.2	<i>Sistema de Screening</i>	38
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
4.1	Testes preliminares.....	40
4.2	Otimização das condições experimentais	40

4.2.1	<i>Planejamento fatorial</i>	40
4.2.2	<i>Superfície de resposta</i>	41
4.2.3	<i>Teste de estabilidade do produto formado</i>	42
4.2.4	<i>Curva analítica</i>	42
4.2.5	<i>Adição de padrão e recuperação</i>	42
4.2.6	<i>Aplicação da metodologia proposta em amostras de cachaça</i>	43
4.2.7	<i>Metodologia comparativa</i>	43
4.2.8	<i>Confirmação da estrutura proposta para o produto</i>	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Testes preliminares	44
5.1.1	<i>Ordem de adição</i>	45
5.1.2	<i>Determinação da porcentagem de etanol</i>	46
5.1.3	<i>pH da solução de reagente</i>	47
5.1.4	<i>Barreiras hidrofóbicas e volume de adição</i>	47
5.2	Comprovação da estrutura dos produtos formados	49
5.3	Otimização das condições experimentais	52
5.3.1	<i>Planejamento fatorial</i>	52
5.3.2	<i>Superfície de resposta</i>	57
5.3.3	<i>Estabilidade do produto da reação</i>	62
5.4	Figuras de mérito	64
5.4.1	<i>Curva analítica</i>	65
5.4.2	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	69

5.4.3	<i>Repetibilidade</i>	70
5.5	Validação da metodologia proposta.....	71
5.5.1	<i>Adição de padrão e recuperação</i>	71
5.5.2	<i>Aplicação da metodologia proposta em amostras de cachaça</i>	73
5.5.3	<i>Metodologia comparativa</i>	76
5.5.4	<i>Comparação dos resultados obtidos</i>	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):

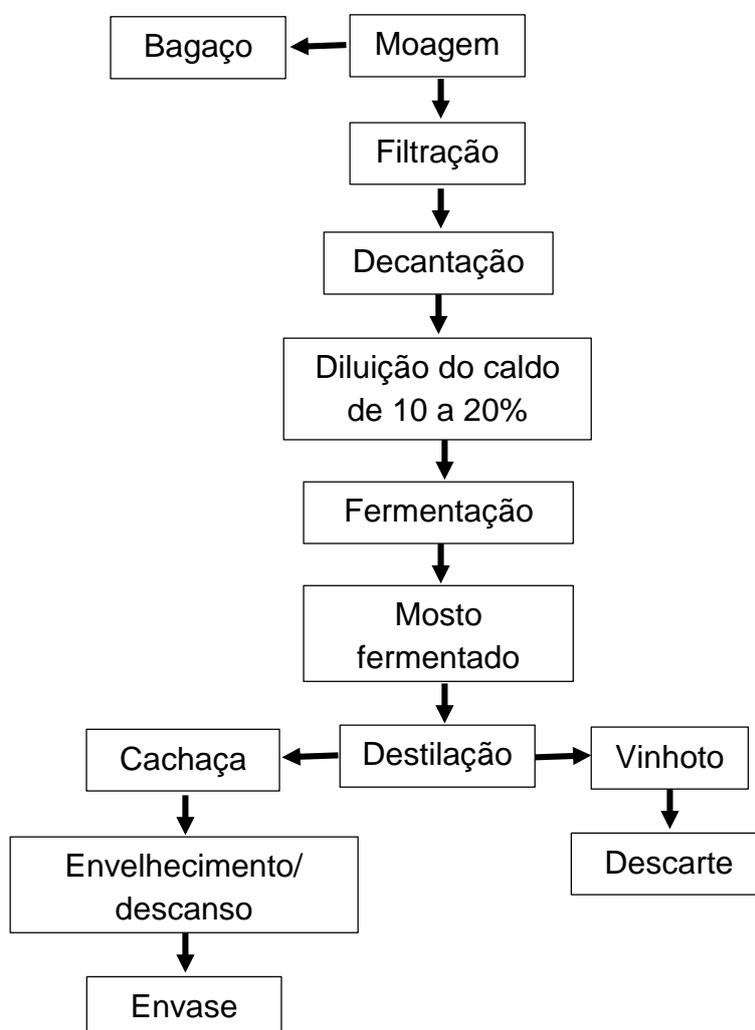


Figura 1 – Fluxograma das etapas de produção da cachaça
Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de SAKAI, 2015

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.

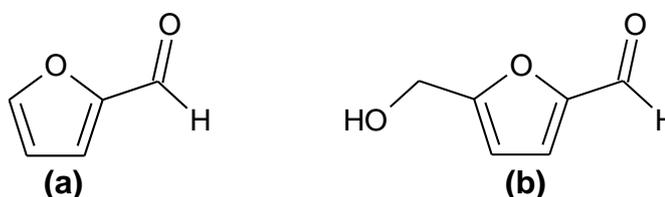


Figura 2 – Fórmula estrutural do (a) FUR (b) HMF
Fonte: elaborado pelo autor

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 ₂ SO 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 bissulfite, ácido barbitúrico e p-toluidina.	ZAPALLÁ, 2005
HPLC com detecção eletroquímica	8,0 x10 ⁻⁷ – 1,0x10 ⁻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 alcólicas 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 ₂ SO ₄ como FM	CASTELLARI, 2001

Fonte: elaborado pelo autor¹

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 45° (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 absorvidades molares (ϵ) e também à concentração de analito no meio (C). Esta relação pode ser expressa através da equação 2 a seguir:

$$k = 2,303\epsilon C$$

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), conseqüentemente, 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:

$$A_R = -\log T_R$$

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 $[C/(1-C)^2]$; 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.

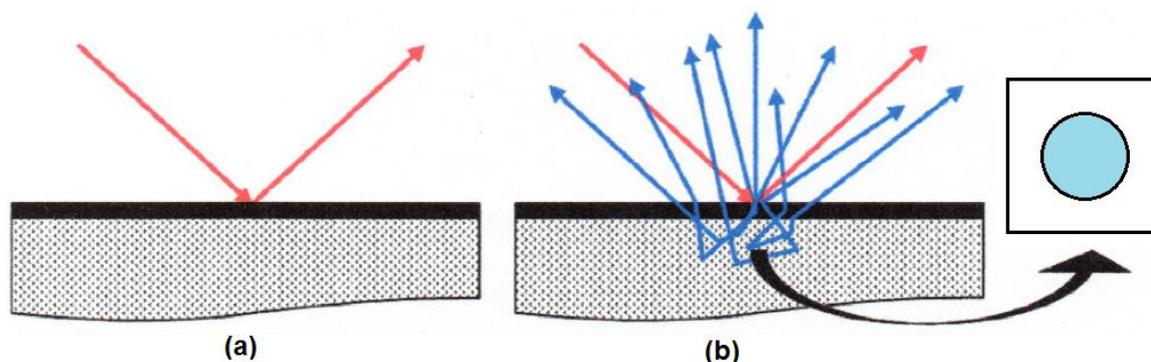


Figura 3 – Esquema representando (a) reflexão especular (b) reflexão difusa
Fonte: adaptado de LUIZ, 2015.

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, conseqüentemente, 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 (μ PAD), 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. Inicialmente, 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.

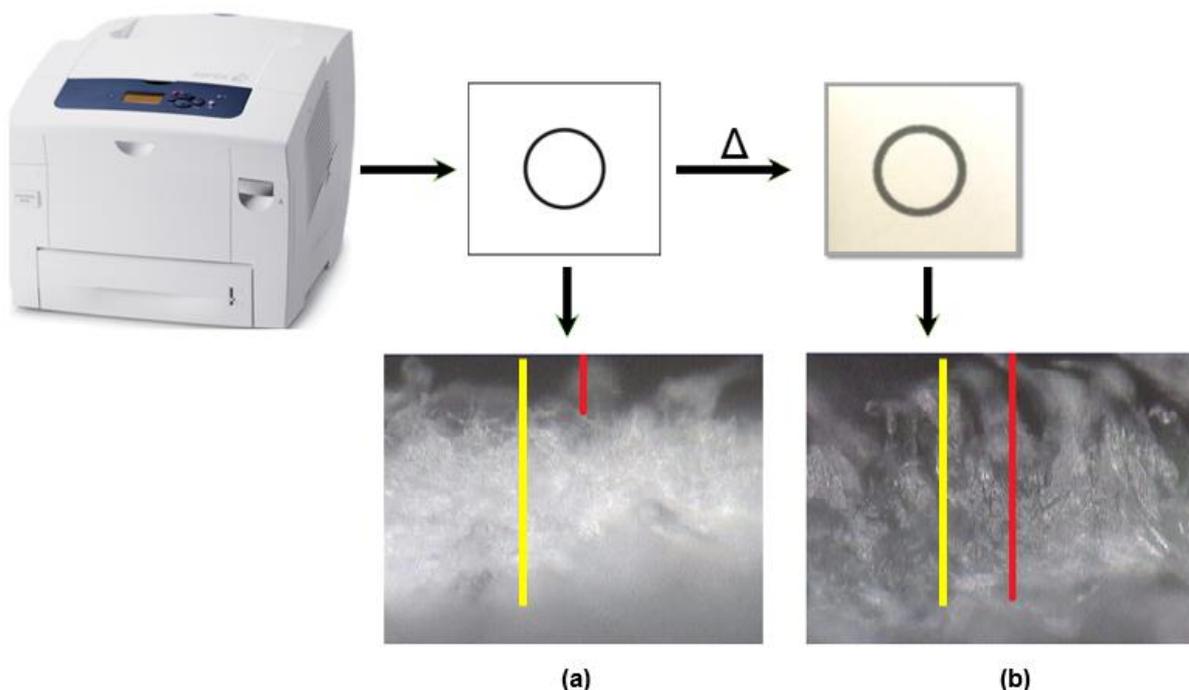


Figura 4 – Esquema representativo da impregnação das barreiras hidrofóbicas no papel de filtro. Corte lateral do papel; em **(a)** tem-se a camada de cera depositada sobre o papel, já em **(b)** nota-se que a cera penetrou nos poros do papel depois do aquecimento. O traço amarelo representa a espessura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

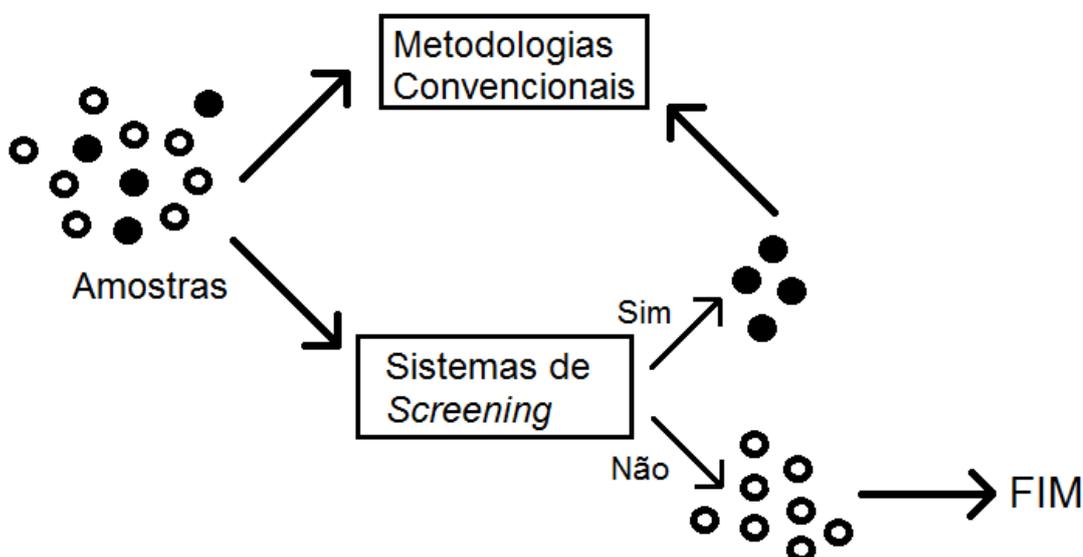


Figura 5 – Esquema representativo das metodologias de *screening*
Fonte: adaptado de Valcárcel, 1999

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 mesmos 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.

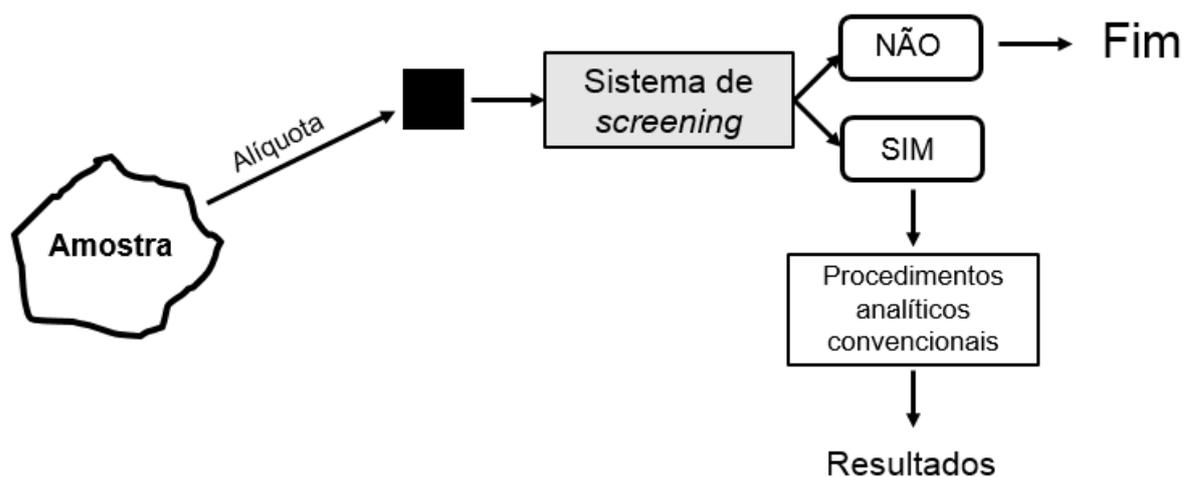


Figura 6 – Esquema de *screening* direto
Fonte: adaptado de Valcárcel, 1999

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.

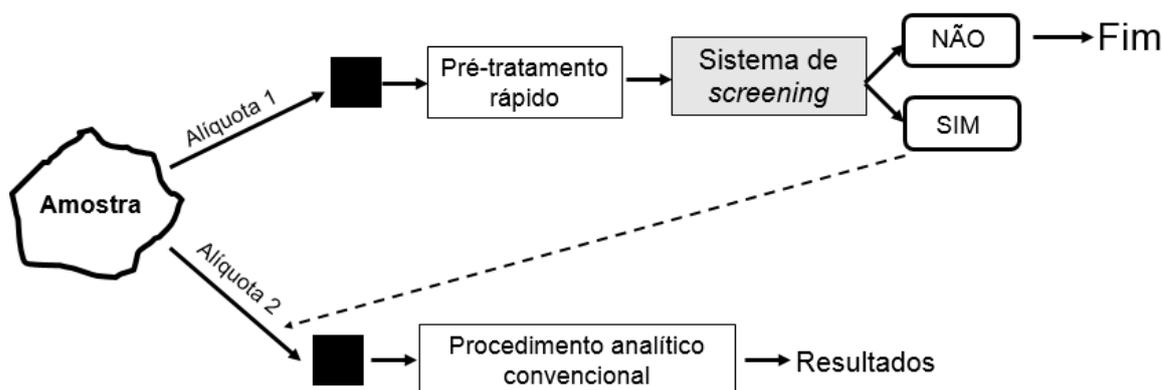


Figura 7 – Esquema de *screening* com pré-tratamento rápido
Fonte: adaptado de Valcárcel, 1999.

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.

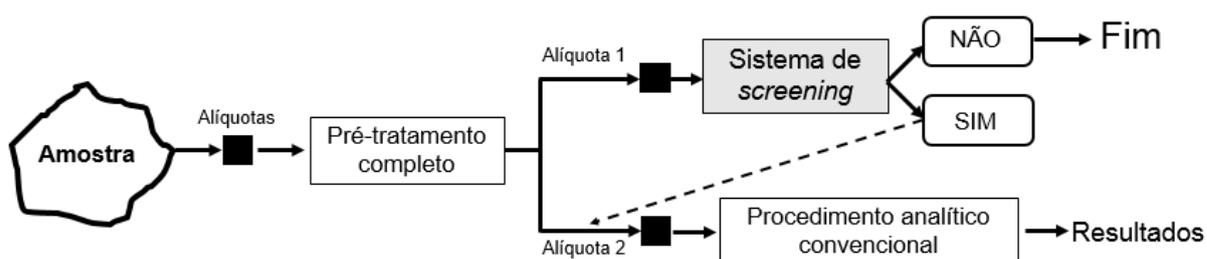


Figura 8 – Esquema de *screening* com pré-tratamento completo
Fonte: adaptado de Valcárcel, 1999.

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 íterim que surgiu 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 tratá-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 tempo real, antes mesmo da formação de qualquer substância nociva;
12. Química intrinsecamente 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.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver uma nova metodologia de *screening* para determinação de furfural e hidroximetilfurfural com detecção por espectroscopia de reflectância difusa associada ao *spot-test* utilizando papel de filtro qualitativo como suporte sólido delimitado com barreiras hidrofóbicas.

A metodologia desenvolvida será aplicada em amostras de cachaça e os resultados obtidos serão comparados estatisticamente com os obtidos por método convencional descrito na literatura.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material e Métodos

A seguir estão descritos os equipamentos, reagentes, soluções e metodologias utilizadas durante a realização dos experimentos necessários para elaboração do presente trabalho.

3.2 Equipamentos utilizados

No presente trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos para obtenção dos dados experimentais:

- Espectrômetro portátil Ocean Optics modelo USB 2000 (Vis) equipado com acessórios de reflectância difusa e software OOIBase32.
- Papel de filtro qualitativo Whatman nº1 foi utilizado como suporte sólido para os spot-test.
 - Materiais de laboratório e vidrarias volumétricas de grau A.
 - Micropipetas de volume variável Eppendorf.
 - Banho termostático Marconi Mini MA 126.
 - pHmetro Micronal modelo B375
 - Banho de ultrassom modelo T14 (com timer) da marca Thorton® com frequência de 40 kHz e potência ultrassônica de 60 W
 - Balança analítica modelo AG204 da marca Mettler Toledo.
 - Estufa marca Fanem, modelo 315 SE
 - Impressora marca Xerox modelo Phaser 8560.
 - Bastão de cera para impressora Xerox modelo Phaser 8560.
 - Sistema de HPLC da marca SHIMADZU LC – 20AT, com injetor automático (SIL – 20A), interface CBM – 20 A prominence e detecção DAD (SPD – M20A)
 - Coluna HPLC C-18 (250 x 4,6 mm e 5 µm de diâmetro de partícula)
 - Espectrômetro de Massas Thermo Scientific LCQ Fleet Ion Trap LC/MSⁿ

3.3 Reagentes

Os reagentes abaixo foram utilizados durante o desenvolvimento da metodologia analítica:

- Ácido p-aminobenzoico (Henrifarma, pureza 99%)
- Ácido barbitúrico (Merck, pureza 99%)
- 5-hidroxi-2-metilfurfural (Sigma-Aldrich, pureza 99%)
- Furfural (Sigma-Aldrich, pureza 98%)
- Ácido clorídrico fumegante (MERCK, pureza: 37% (m/m) p.a.)
- Etanol (J. T. Baker grau HPLC)
- Acetonitrila (J. T. Baker grau HPLC)
- Ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, pureza 99,0%(m/m))
- Acetato de sódio (Sigma-Aldrich, pureza 99,0%)
- Ácido fosfórico (Mallinckrodt, pureza 85%(m/m))
- Di-hidrogenofosfato de potássio (Vetec Química, pureza 99,0%)
- Hidrogenofosfato de potássio (Vetec Química, pureza 98,0%)
- Acetato de amônio (Merck, pureza 98,0%)
- Hidróxido de amônio (Merck, pureza 25%(m/m))
- Carbonato de sódio (Sigma-Aldrich, pureza 99,95%)
- Água deionizada usada no preparo das soluções de reagentes, padrões e amostras (Millipore filtrada com filtro de 0,22 μm , resistividade 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25°C)

3.4 Soluções utilizadas

A soluções utilizadas para o desenvolvimento da metodologia de determinação de FUR e HMF foram:

- Solução estoque de furfural 0,00723 mol L^{-1} em solução etanol 40% (v/v)
- Solução estoque de 5-hidroxi-2-metilfurfural 0,00550 mol L^{-1} em solução etanol 40% (v/v)
- Soluções da curva analítica preparadas a partir de diluições convenientes das soluções estoque dos padrões anteriormente descritas
- Solução de ácido clorídrico padronizado 2,011 mol L^{-1} (JEFFREY, 1989)

- Solução tampão ácido acético ($0,0660 \text{ mol L}^{-1}$) / acetato de sódio ($0,0294 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5
- Solução tampão dihidrogenofosfato de potássio ($0,100 \text{ mol L}^{-1}$) / hidrogeno fosfato de potássio ($0,0617 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,0
- Solução tampão acetado de amônia ($0,0980 \text{ mol L}^{-1}$) / hidróxido de amônia ($0,0569 \text{ mol L}^{-1}$) pH 9,0
- Solução ácida $0,00292 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fosfórico e $0,0346 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético
- Solução de reagente composta por ácido p-aminobenzóico, ácido barbitúrico e ácido clorídrico preparada em meio aquoso.

3.5 Metodologias

3.5.1 *Spot-test*

Os *spot-test* são procedimentos químicos que podem ser usados para identificar e quantificar uma substância por meio de uma reação entre o analito de interesse e um reagente em um suporte sólido, por exemplo placa de toque, papel de filtro, entre outros. A formação do produto deve ser mensurável de alguma maneira, como, por exemplo, mudança de coloração, evolução de gás, ou mesmo formação de precipitado. (BENEDETTI, 2015; TININIS, 2000; FEIGL, 1966; JUNGREIS, 1997).

A solução de reagente composta por AB e PABA é feita em um único balão volumétrico de 50,00 mL, no qual são adicionados os reagentes e, em seguida, o ácido clorídrico para então, completar-se o volume do balão com água deionizada até o menisco.

A metodologia aqui descrita é baseada na reação de furfural e hidroximetilfurfural com ácido p-aminobenzoico e ácido barbitúrico utilizando papel de filtro qualitativo Whatman nº1 como suporte sólido. No papel de filtro estão impregnadas barreiras hidrofóbicas que permitem a concentração da mancha formada na zona delimitada pela barreira impressa por impressora com tinta à base de cera e impregnada após aquecimento em estufa a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por dois minutos. A seguir, tem-se

um exemplo da aplicação dos analitos e reagente no *spot-test* (figura 9).

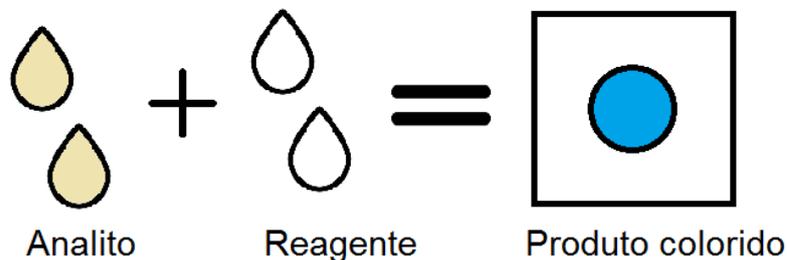


Figura 9 – Procedimento para reação no *spot-test*
Fonte: elaborada pelo autor

No presente trabalho, os analitos são quantificados separadamente, sendo assim, para cada analito há um *spot-test* individual.

As barreiras hidrofóbicas são desenhadas com auxílio de um software gráfico e são impressas no papel de filtro usado como suporte sólido com auxílio de uma impressora comercial marca Xerox modelo Phaser 8560 e, após a impressão das barreiras, o papel é submetido a aquecimento em estufa, ou chapa de aquecimento.

A aplicação das soluções de reagente e analito foi feita com auxílio do suporte para micropepitas esquematizado na figura 10, para garantir que as soluções fossem aplicadas a partir de uma mesma altura e no mesmo local do *spot-test*, gerando assim, manchas mais uniformes.

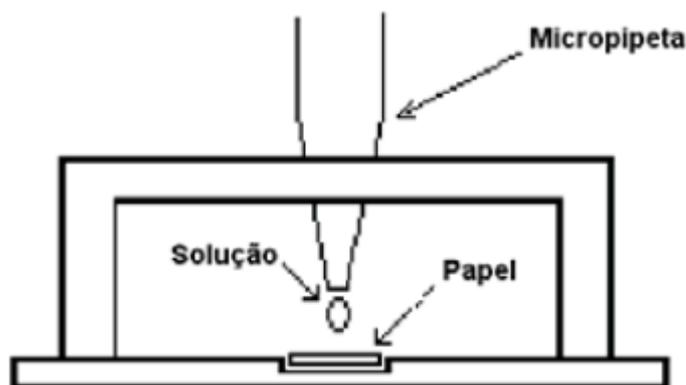


Figura 10 – Suporte utilizado para aplicação de *spot-test*
Fonte: adaptado de Tubino, 1997

3.5.2 Sistema de Screening

Como já mencionado anteriormente, as metodologias de *screening* permitem

acesso rápido aos resultados desejados e sua principal característica é a resposta binária do tipo SIM/NÃO para o analito de interesse. O resultado encontrado é capaz de fornecer informações se o analito presente está abaixo ou acima de um limite pré-estabelecido e em alguns casos é possível quantificar o analito (MANGANIELLO, 2002; CATELANI, 2014; FERNANDES, F., 2015).

As metodologias de *screening* permitem maior rapidez na análise, uma vez que somente os resultados considerados “positivos” são analisados por métodos conceituados, como os cromatográficos, o que, por sua vez, causa economia de reagentes, tornando, assim, a metodologia em desenvolvimento, mais econômica e ambientalmente mais amigável.

No presente trabalho, foi utilizada uma metodologia de *screening* que fornece resultados qualitativos e quantitativos, uma vez que, além de sinalizar se o analito em questão está acima ou abaixo de um limite pré-estabelecido, é possível quantificar o analito presente na amostra, desde que o mesmo se encontre acima do limite de quantificação do método desenvolvido no presente trabalho.

A seguir, na figura 11, é possível visualizar um esquema representativo de metodologias de *screening* associado ao *spot-test*, no qual são feitas as análises por metodologias convencionais caso não haja formação de um produto colorido, ou para confirmação da resposta obtida pela metodologia de *screening*.

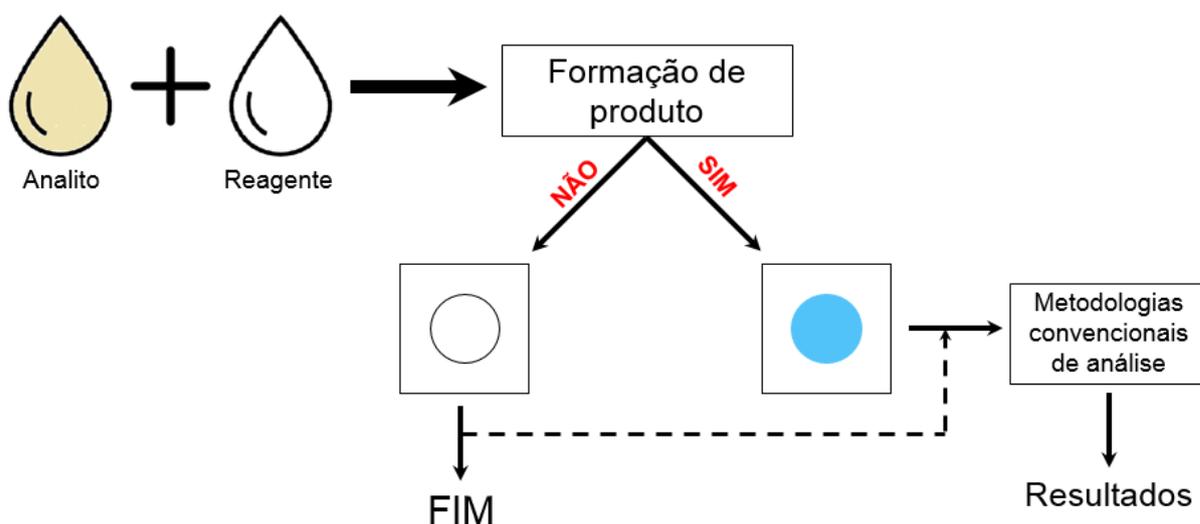


Figura 11 – Esquema representativo de metodologias de *screening* associadas às metodologias de *spot-test*

Fonte: elaborado pelo autor²

² As figuras de 11 até 35 foram elaboradas pelo autor.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Testes preliminares

Primeiramente, foram selecionados os reagentes cromogênicos para reação com hidroximetilfurfural e furfural. Essa seleção foi baseada em estudos prévios realizados em nosso do grupo de pesquisa (CASTOLDI, 2014), sendo selecionados o ácido p-aminobenzoico (PABA) e o ácido barbitúrico (AB) para reação com ambos os analitos.

Em seguida foram feitos testes para a determinação da porcentagem ideal de etanol na solução do analito, visto que a matriz a ser utilizada é constituída primordialmente de água e etanol, geralmente na proporção de 38-39% do álcool. Foram realizados testes com as seguintes porcentagens de etanol (grau HPLC) em água: 35%, 40%, 45%, 50% e 55% (v/v).

Na sequência, foram realizados testes para definir o pH da solução de reagente, sendo testados pH em soluções ácida, neutra, básica e pH da água deionizada. Para o pH da solução ácida foi preparado um tampão de ácido acético/acetato com pH igual a 4,5; já para o tampão básico, foi preparado um tampão de amônia/amônio com pH igual a 9,0; para o pH da solução neutra foi utilizado tampão de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ com pH igual a 7,0; o pH da água deionizada foi medido e obteve-se o valor de 6,5.

Após ser definido o pH da solução de reagente, foram realizados testes com as barreiras hidrofóbicas no papel usado como suporte sólido. As barreiras hidrofóbicas foram impregnadas no papel com auxílio da impressora de cera, e posteriormente foram aquecidas em estufa a 120°C por dois minutos.

4.2 Otimização das condições experimentais

4.2.1 Planejamento fatorial

Tendo sido definido o pH da solução de reagente, deu-se início a otimização das condições experimentais. Primeiramente, foi realizado um planejamento fatorial do tipo 2^3 , gerando um total de oito experimentos. A matriz do planejamento foi

construída utilizando o *software* Minitab 16. Na tabela 2, pode-se observar os fatores analisados para as reações de cada analito com suas respectivas codificações.

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

Fatores	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
[PABA]	0,0109 mol L ⁻¹	0,0438 mol L ⁻¹
[AB]	0,00781 mol L ⁻¹	0,0312 mol L ⁻¹
[H ⁺]	4,74 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	4,61 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹

Na tabela 3 estão apresentados os ensaios realizados com os respectivos fatores utilizados. Os valores de [PABA], [AB] e [H⁺] foram empregados para ambos os analitos em planejamento individual para cada um deles (FUR e HMF), e as concentrações de analitos utilizadas na execução dos experimentos de planejamento fatorial foram de 25 mg L⁻¹ para o FUR e de 50 mg L⁻¹ para o HMF.

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

Ensaio	[PABA]	[Ác. Bartúrico]	[H ⁺]
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

4.2.2 Superfície de resposta

Após serem realizados os experimentos do planejamento fatorial, foram feitos os experimentos necessários para elaboração de uma superfície de resposta para cada uma das reações; sendo que em cada reação foram utilizados somente os dois fatores que exerciam maior influência durante a determinação dos analitos.

Para a construção da superfície de resposta do FUR, os fatores analisados foram a concentração de PABA e de H⁺ na solução de reagente; enquanto para a superfície de resposta do HMF, os fatores de maior influência são a concentração de AB e de H⁺ na solução de reagente.

O intervalo de valores analisados para a reação de cada um dos analitos pode ser visualizado na tabela 4 a seguir:

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

FUR		HMF	
Parâmetro	Intervalo de concentração (mol L ⁻¹)	Parâmetro	Intervalo de concentração (mol L ⁻¹)
[PABA]	0,015 – 0,045	[AB]	0,005 – 0,020
[H ⁺]	0,005 – 0,025	[H ⁺]	0,10 – 0,50

4.2.3 Teste de estabilidade do produto formado

Em seguida, foi realizado o teste de estabilidade para cada um dos produtos formados. Foram tomadas as medidas de densidade ótica de medidas de reflectância até o tempo de 180 minutos.

4.2.4 Curva analítica

Após terem sido otimizados todos os parâmetros experimentais, partiu-se para a construção da curva analítica individual para cada um dos analitos. As medidas foram feitas com o auxílio de um acessório de reflectância ao espectrômetro portátil Ocean Optics. As soluções utilizadas para construção da curva analítica foram feitas a partir de diluições convenientes das soluções estoque dos padrões dos analitos descritas anteriormente no item 3.3.

Depois de construídas as curvas analíticas, foram realizados testes de repetibilidade inter-dia e intra-dia.

4.2.5 Adição de padrão e recuperação

A fim de avaliar a interferência da matriz na determinação dos analitos, foram feitos testes de adição de padrão e recuperação, nos quais foram realizadas fortificações de padrão em amostras no intervalo de 50 a 250%. Também se utilizou dois tipos de amostras durante os testes de avaliação de interferência da matriz, cachaça envelhecida e não adoçada e também cachaça adoçada e não envelhecida.

4.2.6 Aplicação da metodologia proposta em amostras de cachaça

A metodologia aqui desenvolvida foi então aplicada em amostras de cachaça provenientes de diversas cidades do estado de São Paulo, bem como em amostras provenientes de outros estados. Não foram realizadas etapas de *clean-up* da amostra, sendo que as amostras foram diretamente aplicadas sobre o papel de filtro usado como suporte sólido no *spot-test*.

4.2.7 Metodologia comparativa

Os resultados obtidos pela metodologia proposta foram comparados com os resultados obtidos através de uma metodologia já descrita na literatura. Optou-se pela utilização de uma metodologia cromatográfica (ALCÁZAR, 2006) devido a confiabilidade dos resultados gerados dada a robustez desta técnica.

As condições cromatográficas empregadas nesta metodologia estão descritas na tabela 5 a seguir:

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

Coluna	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m)
Fase móvel	ACN: solução ácida H ₃ PO ₄ , CH ₃ COOH 18:82
Vazão	1,2 mL/min
Volume de injeção	20 μ L
Deteção	DAD com λ = 280nm
Tempo de cada corrida	7 min

4.2.8 Confirmação da estrutura proposta para o produto

Na intenção de confirmar a estrutura suposta dos produtos formados pela reação de cada um dos analitos com PABA e AB, foi feita uma análise por espectrometria de massas do tipo *full scan* no modo negativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados com suas respectivas discussões a respeito do desenvolvimento da nova metodologia para determinação de FUR e HMF em amostras de cachaça.

5.1 Testes preliminares

Os reagentes selecionados para determinação de FUR e HMF, conforme mencionado anteriormente, foram ácido p-aminobenzoico e ácido barbitúrico. A reação dessas substâncias com FUR resulta num produto de coloração azul com máximo de absorção (λ_{\max}) em aproximadamente 616 nm; já o produto dessas substâncias com HMF possui coloração amarela com λ_{\max} em 420 nm. Na figura 12 a seguir é possível visualizar a coloração do produto obtido pelas reações anteriormente descritas no papel de filtro qualitativo Whatman nº 1. Nas figuras 13 e 14 encontram-se os espectros de absorção dos produtos formados pela reação com FUR e HMF, respectivamente.

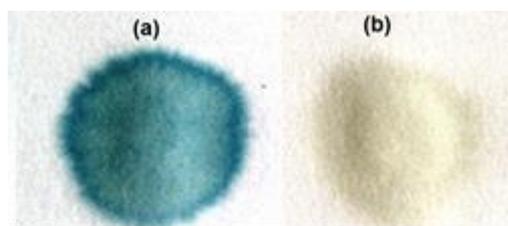


Figura 12 – Produto da reação do PABA e AB com **(a)** FUR **(b)** HMF nas concentrações de 100 mg L⁻¹ cada um dos analitos

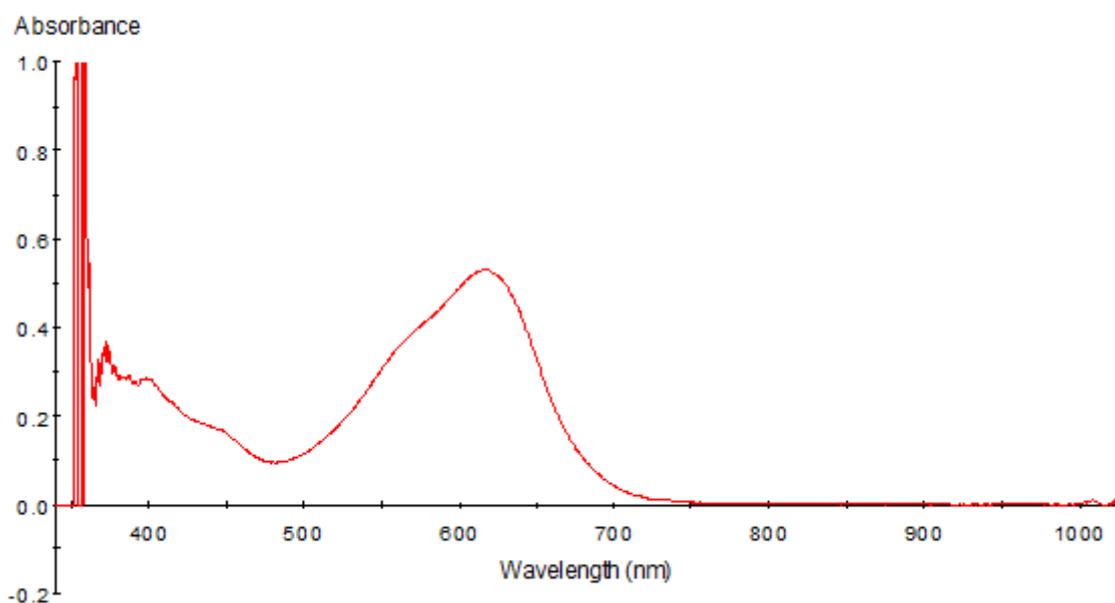


Figura 13 – Espectro de absorção do produto obtido a partir da reação do PABA 0,054 mol L⁻¹ e AB 0,017 mol L⁻¹ com FUR 1,04 x 10⁻³ mol L⁻¹

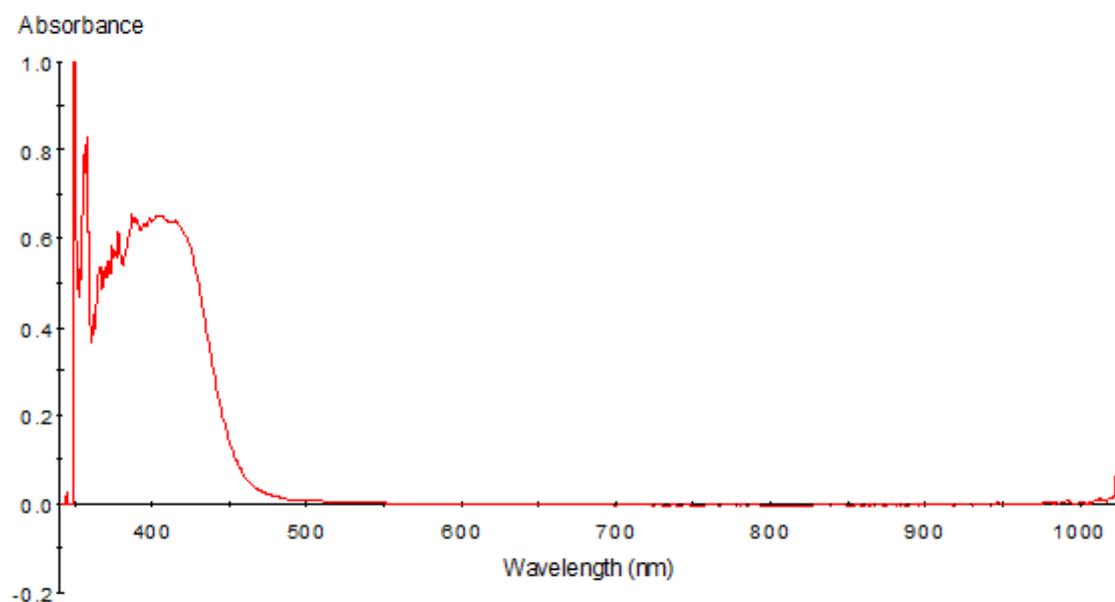


Figura 14 – Espectro de absorção do produto obtido a partir da reação do 0,054 mol L⁻¹ e AB 0,017 mol L⁻¹ com HMF 7,93 x 10⁻⁴ mol L⁻¹

5.1.1 Ordem de adição

A fim de obter uma melhor resposta analítica, foi testada a ordem de adição entre a solução de reagente e o analito. Na tabela 6 a seguir, é possível observar que a ordem de adição que obteve maior sinal analítico como resposta foi adicionando

primeiro a solução de reagente e em seguida, a solução de analito. Isso acontece devido à volatilidade dos analitos, ou seja, quando o analito é adicionado antes da solução de reagente, o mesmo evapora parcialmente, resultando em uma menor resposta analítica.

A solução de analito é aplicada ao papel imediatamente após a aplicação da solução de reagente, ou seja, antes que ocorra a secagem do reagente no papel; caso contrário, não ocorrerá formação da coloração.

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

Ordem	Reagente + Analito		Analito + Reagente	
Analito (50 mg L ⁻¹)	HMF	FUR	HMF	FUR
A_R	0,116	0,236	0,034	0,140

5.1.2 Determinação da percentagem de etanol

Em relação aos testes para determinação da percentagem ideal de etanol no preparo da solução de analito, a percentagem selecionada foi de 40% (V/V) de etanol, uma vez que a variação de A_R em função da percentagem de etanol é praticamente desprezível, como pode ser visto na figura 15 a seguir. Também, como já dito anteriormente, optou-se pela percentagem selecionada pois a maioria das amostras possui teor alcoólico em torno de 38-39%.

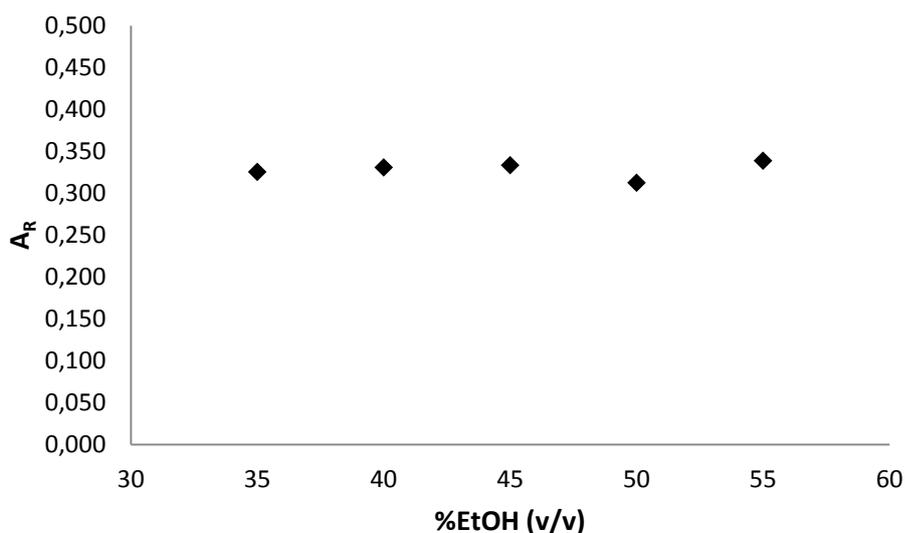


Figura 15 – A_R em função da porcentagem (%) de etanol na solução de analito de concentração igual a 50 mg L⁻¹ em $\lambda = 616$ nm (n=3)

5.1.3 pH da solução de reagente

Tendo sido determinada a porcentagem de etanol a ser utilizada, foi determinado o pH da solução de reagente. Dentre os pHs testados, aquele que forneceu melhor resposta foi pH ácido, como pode ser observado na tabela 7 a seguir:

Tabela 7 – Valores de A_R obtidos em diferentes meios

Meio	A _R FUR 25 mg L ⁻¹ ($\lambda=616$ nm)	A _R HMF 25 mg L ⁻¹ ($\lambda=420$ nm)
Tampão ácido (pH 4,5)	0,258	0,157
Tampão básico (pH 9,0)	0,039	0,020
Tampão neutro (pH 7,0)	0,078	0,110
Água deionizada (pH 6,4)	0,150	0,125

Dessa maneira, foi utilizada a solução de reagente com tampão ácido. Na escolha do pH da solução de reagente foi utilizado tampão ácido acético/ acetato de sódio; entretanto, desde a otimização das condições experimentais até o término dos experimentos, foi utilizada solução de ácido clorídrico padronizada, uma vez que, conforme será visto mais detalhadamente a seguir, é necessário um valor de pH menor do que o pH fornecido pela solução tampão.

5.1.4 Barreiras hidrofóbicas e volume de adição

Foram realizados testes sem as barreiras hidrofóbicas impregnadas no papel

e, em seguida, com as barreiras impregnadas no papel de filtro. Na figura 16 apresentada a seguir é possível visualizar nitidamente que a presença das barreiras hidrofóbicas no papel resulta em manchas mais nítidas e homogêneas do que aquelas obtidas no papel sem as barreiras hidrofóbicas.

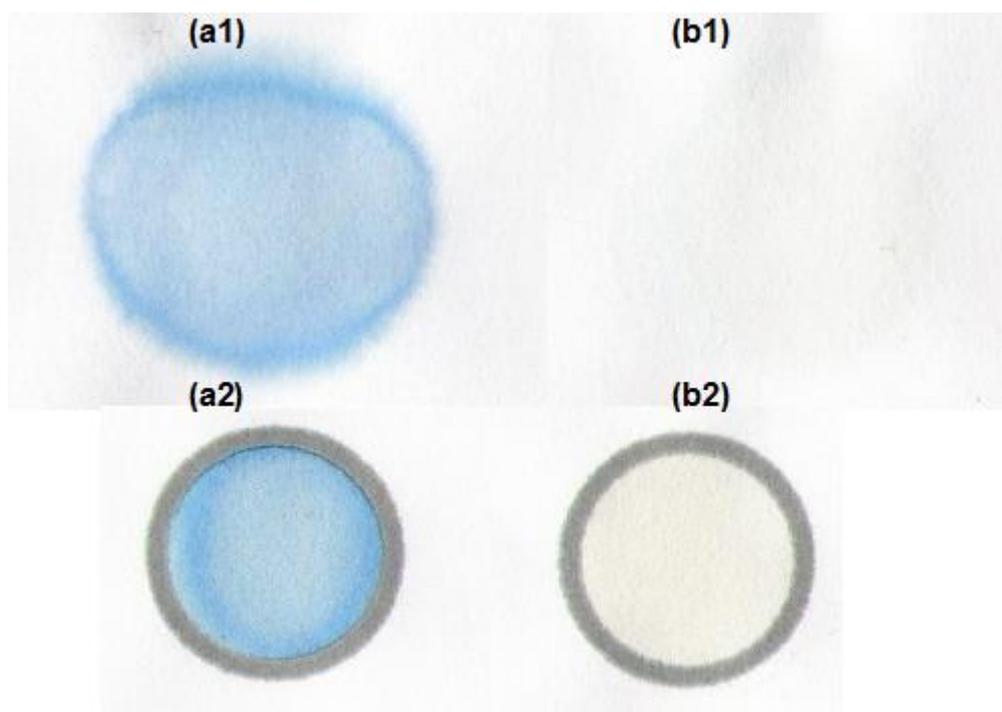


Figura 16 – Coloração do produto obtido pela reação de PABA e AB com **(a1)** FUR, no papel sem barreiras hidrofóbicas **(b1)** HMF no papel sem barreiras hidrofóbicas **(a2)** FUR no papel com barreiras hidrofóbicas **(b2)** HMF no papel com barreiras hidrofóbicas. A concentração de ambos os analitos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

Entretanto, as diferenças nos resultados alcançados utilizando as barreiras hidrofóbicas não é somente qualitativa. Nota-se, pelos resultados apresentados na tabela 8, que ao utilizar os papeis de filtros impregnados com as barreiras hidrofóbicas, os valores de A_R obtidos são significativamente superiores do que quando não se utilizam os papéis com área delimitada. Também é possível observar que há maior precisão, devido ao menor valor de desvio-padrão observado, quando as barreiras hidrofóbicas estão presentes; uma vez que, conforme já afirmado anteriormente, ao delimitar a área do papel de filtro por meio das barreiras hidrofóbicas, as manchas geradas são mais nítidas e mais uniformes, o que faz aumentar a sensibilidade e precisão da nova metodologia aqui proposta.

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

	FUR	HMF
Sem barreiras	0,23±0,02	0,14±0,01
Com barreiras	0,304±0,006	0,185±0,005

O diâmetro utilizado para construção das barreiras hidrofóbicas foi de 1,5 cm de diâmetro e 0,75 cm de espessura. Este valor foi escolhido pois o orifício do espectrofotômetro possui 1 cm de diâmetro, sendo assim, seria necessário um valor maior no diâmetro da área delimitada pelas barreiras para que fossem realizadas as medidas confortavelmente. Entretanto, o valor do diâmetro estabelecido para as barreiras hidrofóbicas não poderia ser muito superior a 1,5 cm, pois, caso contrário, as manchas formadas não seriam tão uniformes e nítidas quanto às obtidas com o valor de diâmetro já selecionado. Também, outro motivo pelo qual não se pode diminuir o diâmetro da barreira hidrofóbica é que, após o aquecimento do papel de filtro durante a confecção das barreiras hidrofóbicas, há um espalhamento lateral da cera depositada, o que provoca uma diminuição do diâmetro inicial; sendo que, após o aquecimento, o diâmetro da barreira passa a ser de aproximadamente 1,3 cm.

5.2 Comprovação da estrutura dos produtos formados

Não foram encontradas descrições na literatura a respeito da estrutura do produto formado pela reação do ácido p-aminobenzoico e ácido barbitúrico com os analitos FUR e HMF. Dessa forma, suspeita-se que o produto formado seja um análogo do produto reação de Winkler utilizada para quantificação de HMF em amostras de mel (WINKLER, 1955); com a diferença que aqui a anilina utilizada foi substituída pelo ácido p-aminobenzoico. Nas figuras a seguir, encontram-se as reações dos analitos com os reagentes selecionados (figuras 17 e 18).

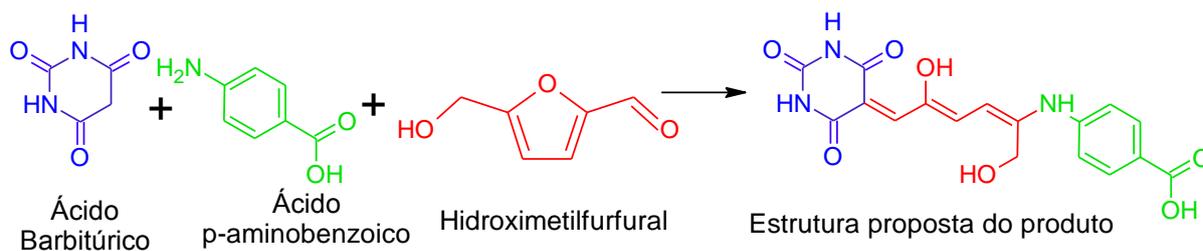


Figura 17 – Reação do PABA e AB com HMF

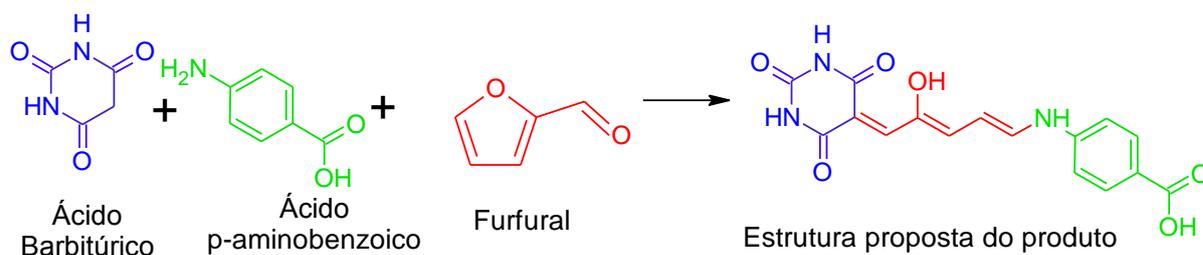


Figura 18 – Reação do PABA e AB com FUR

No mecanismo proposto por Winkler, há abertura do anel furânico, resultando num produto que possui insaturações conjugadas, o que facilita a movimentação eletrônica e faz com que haja absorção na região do visível do espectro eletromagnético.

Como afirmado anteriormente, a estrutura dos produtos foi confirmada por análises de espectrometria de massas no modo *full scan* negativo. A estrutura dos produtos provenientes da reação dos analitos com os reagentes PABA e AB encontra-se descrita a seguir nas figuras 17 e 18. As etapas do mecanismo da reação não estão demonstradas, uma vez que este não é o objetivo deste trabalho.

Como pode ser visto no fragmentograma referente ao produto formado pela reação de PABA e AB com HMF a seguir (figura 19), o pico do íon molecular corresponde a m/z 372 o que reforça a suposição da estrutura proposta para o produto da reação, visto que esta possui massa molar de aproximadamente 373 g mol^{-1} . A diferença de 1 corresponde a perda de um hidrogênio durante a ionização da amostra para análise por espectrometria de massas.

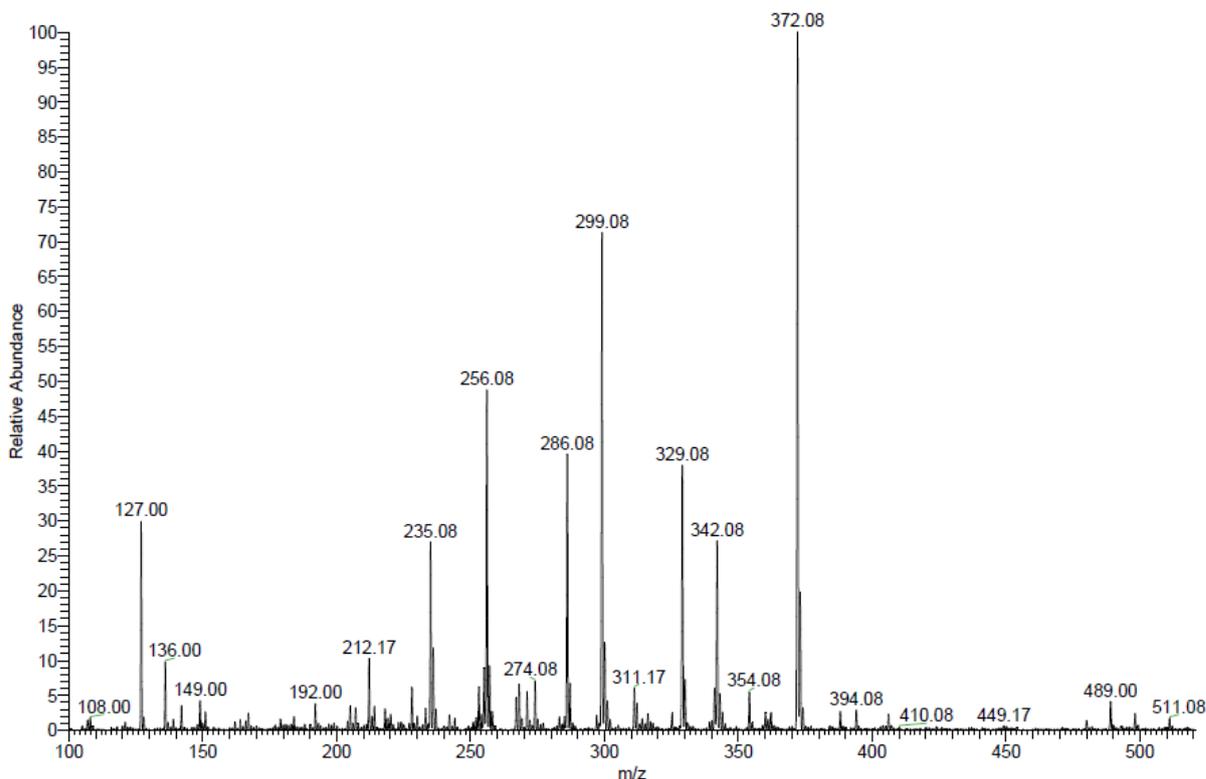


Figura 19 – Fragmentograma referente ao produto formado pela reação com HMF

Os picos em m/z 373, 342, 329, 299, 286 e 256 representam o íon molecular protonado (M), a perda de H+O, CONH, (H₂O+CONH), 2(CONH) e (H₂O+(CONH)₂), respectivamente. Os demais picos representados no fragmentograma não apresentam relevância quanto à decodificação da estrutura proposta.

No fragmentograma referente a reação com FUR (figura 20) tem-se que o pico do íon molecular tem m/z 342 referente a perda de um hidrogênio da molécula proposta, cuja estrutura se encontra na figura 18, com massa molar de aproximadamente 343 g mol⁻¹.

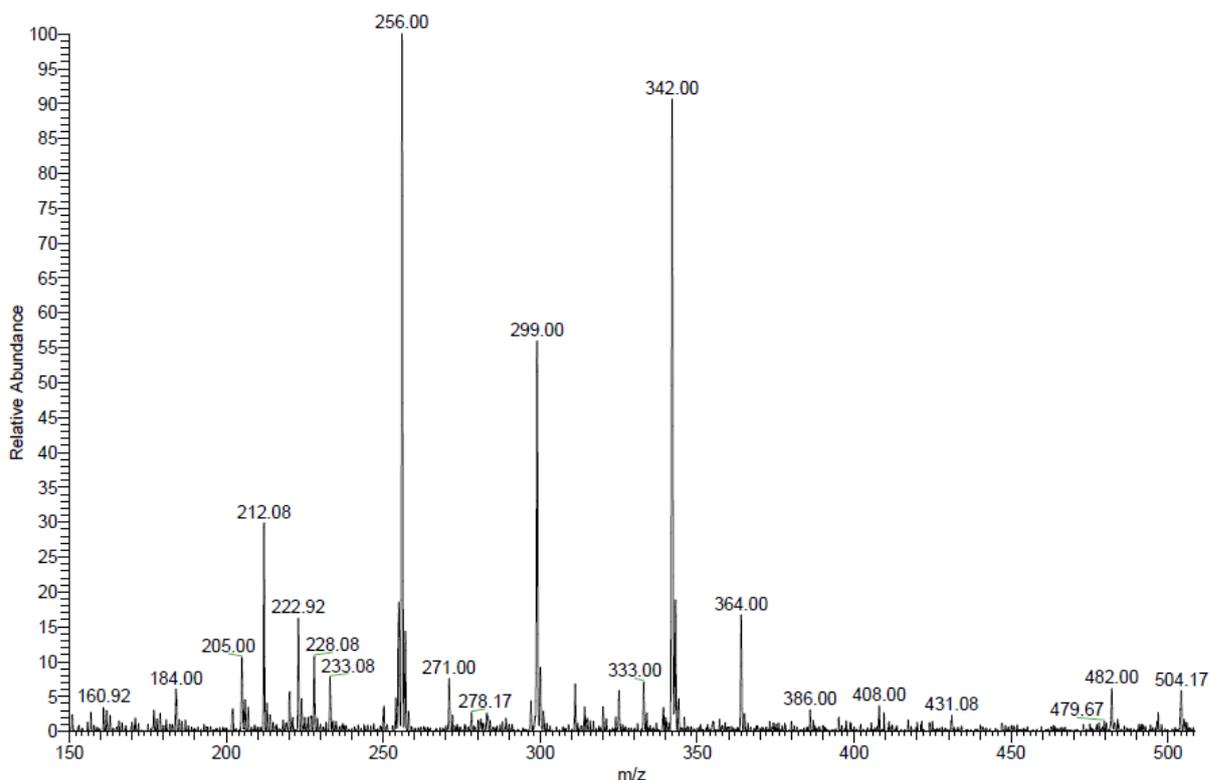


Figura 20 – Fragmentograma referente ao produto formado pela reação com FUR

O pico do íon molecular está presente em m/z 342, representando a perda de um hidrogênio, referente à ionização da molécula. Os picos em m/z 299 e 256 representam, respectivamente, CONH e 2(CONH). Os demais picos representados no fragmentograma não apresentam relevância quanto à decodificação da estrutura proposta.

5.3 Otimização das condições experimentais

Finalizados os testes preliminares, deu-se início à otimização das condições experimentais de análise, onde foram estabelecidos os valores ideais para as concentrações dos reagentes utilizados na determinação dos analitos estudados.

5.3.1 Planejamento fatorial

Os resultados obtidos para os experimentos do planejamento fatorial realizado podem ser vistos na tabela 9 a seguir. Esses resultados são referentes às condições anteriormente apresentadas nas tabelas 2 e 3.

Tabela 9 – Resultados obtidos nos ensaios do planejamento fatorial

Ensaio	[PABA] (mol L ⁻¹)	[AB] (mol L ⁻¹)	[H ⁺] (mol L ⁻¹)	A _R média FUR (λ=616nm)	A _R média HMF (λ=420nm)
1	0,01094	0,00781	4,74x10 ⁻⁵	0,037±0,003	0,210±0,015
2	0,04375	0,00781	4,74x10 ⁻⁵	0,144±0,006	0,200±0,015
3	0,01094	0,03124	4,74x10 ⁻⁵	0,024±0,001	0,108±0,008
4	0,04375	0,03124	4,74x10 ⁻⁵	0,074±0,005	0,102±0,006
5	0,01094	0,00781	4,61x10 ⁻³	0,080±0,004	0,261±0,006
6	0,04375	0,00781	4,61x10 ⁻³	0,208±0,003	0,277±0,004
7	0,01094	0,03124	4,61x10 ⁻³	0,069±0,006	0,250±0,010
8	0,04375	0,03124	4,61x10 ⁻³	0,178±0,006	0,225±0,007

Observa-se pelos resultados da Tabela 8 que tanto para a reação com FUR quanto para HMF, o ensaio que obteve a maior resposta para os analitos foi o de número 6 o qual possui as concentrações correspondentes de PABA, AB e H⁺ iguais a 0,04375 mol L⁻¹; 0,00781 mol L⁻¹ e 4,61x10⁻³ mol L⁻¹, respectivamente.

A seguir são apresentados os gráficos de efeitos principais para as reações de ambos os analitos (figuras 19 e 20). Nesse tipo de gráfico, quanto maior a inclinação do segmento de reta correspondente a um fator, maior influência esse fator exerce na resposta.

Na figura 21, correspondente ao gráfico de efeitos principais da reação de PABA e AB com FUR, nota-se que os fatores que exercem maior influência nesta reação são a concentração de PABA e a concentração de H⁺ na solução de reagente, sendo que, conforme pode ser observado na figura 19, uma maior concentração de PABA corresponde a uma maior resposta analítica, também para H⁺ tem-se que uma maior concentração corresponde a uma maior resposta analítica; enquanto, para o fator de menor influência (concentração AB), uma menor concentração corresponde a uma maior resposta analítica.

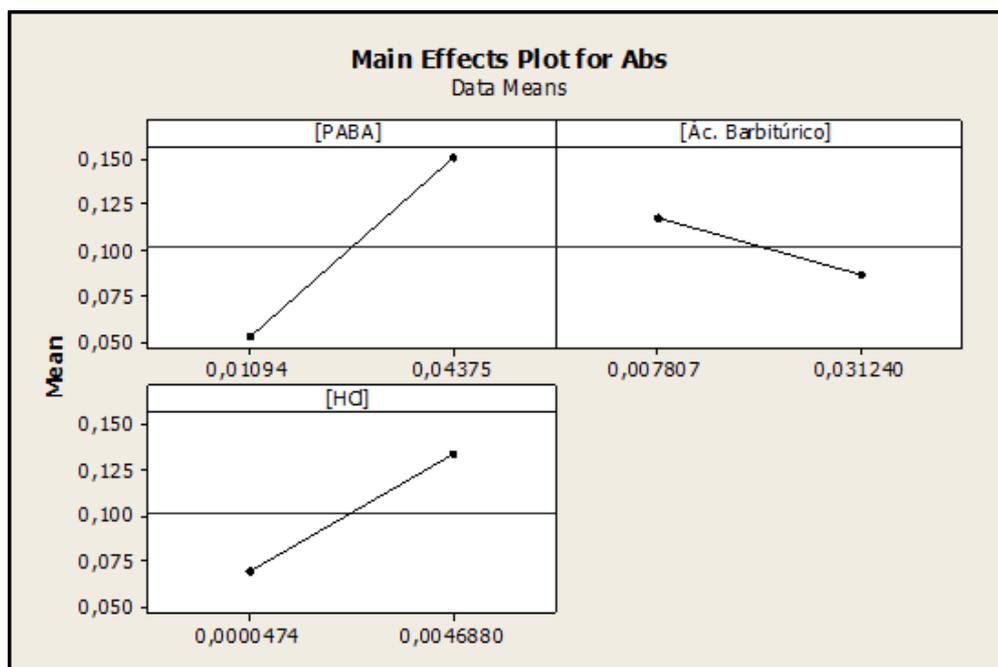


Figura 21 – Gráfico de efeitos principais para reação com FUR

Na figura 22, tem-se o gráfico de efeitos principais para reação de PABA e AB com HMF, no qual é possível observar que os fatores que exercem maior influência na reação são a concentração de AB e a concentração de H^+ ; sendo que uma menor concentração de AB fornece uma maior resposta analítica e uma maior concentração de H^+ fornece uma maior resposta analítica. O fator de menor influência na reação com HMF é a concentração de PABA, aqui uma menor concentração gera uma maior resposta analítica, mas, como pode ser observado na figura 20, a variação da concentração de PABA não possui influência tão significativa quanto os dois outros fatores estudados, entretanto, isso não faz do PABA uma substância dispensável, uma vez que, caso o PABA ou AB não estejam presentes na solução de reagente não há formação do produto amarelo característico. A mesma observação é válida para reação com FUR.

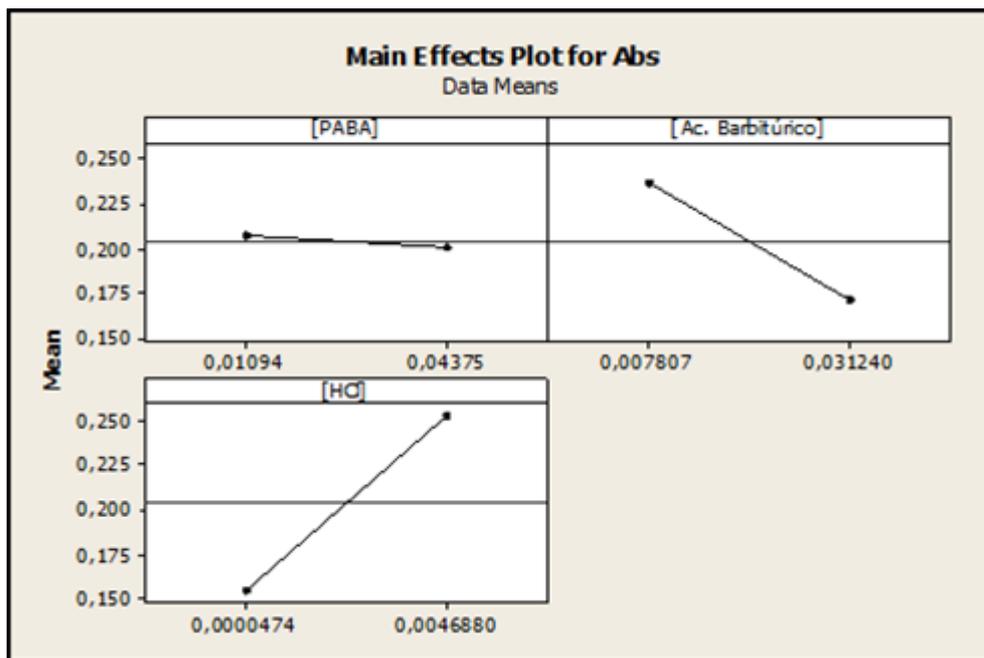


Figura 22 – Gráfico de efeitos principais para reação com HMF

A seguir são apresentados os gráficos de Pareto (figuras 23 e 24) obtidos após a realização dos experimentos referentes ao planejamento fatorial. Nestes gráficos as barras que representam os fatores analisados devem estar abaixo da linha tracejada para que se considere que, dentro do intervalo estudado, o parâmetro está otimizado. A linha tracejada simboliza o intervalo de confiança de 95%. Sendo assim, caso a barra esteja abaixo da linha tracejada, tem-se que o parâmetro analisado não influi de maneira significativa na análise.

Como pode ser observado nas figuras 23 e 24, nenhuma das barras ultrapassou a linha tracejada, sendo assim, é possível afirmar que, dentro do intervalo analisado, nenhum dos fatores avaliados possui influência significativa na determinação de ambos os analitos com nível de confiança de 95%.

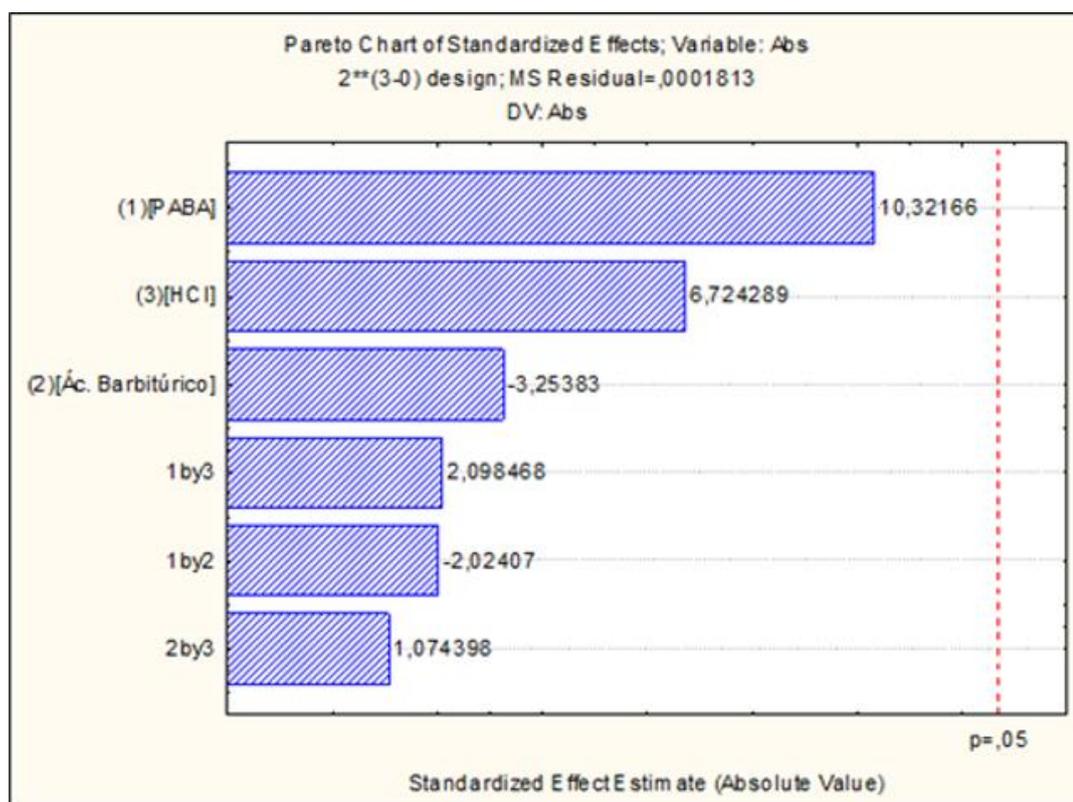


Figura 23 – Gráfico de Pareto para reação do PABA e AB com FUR

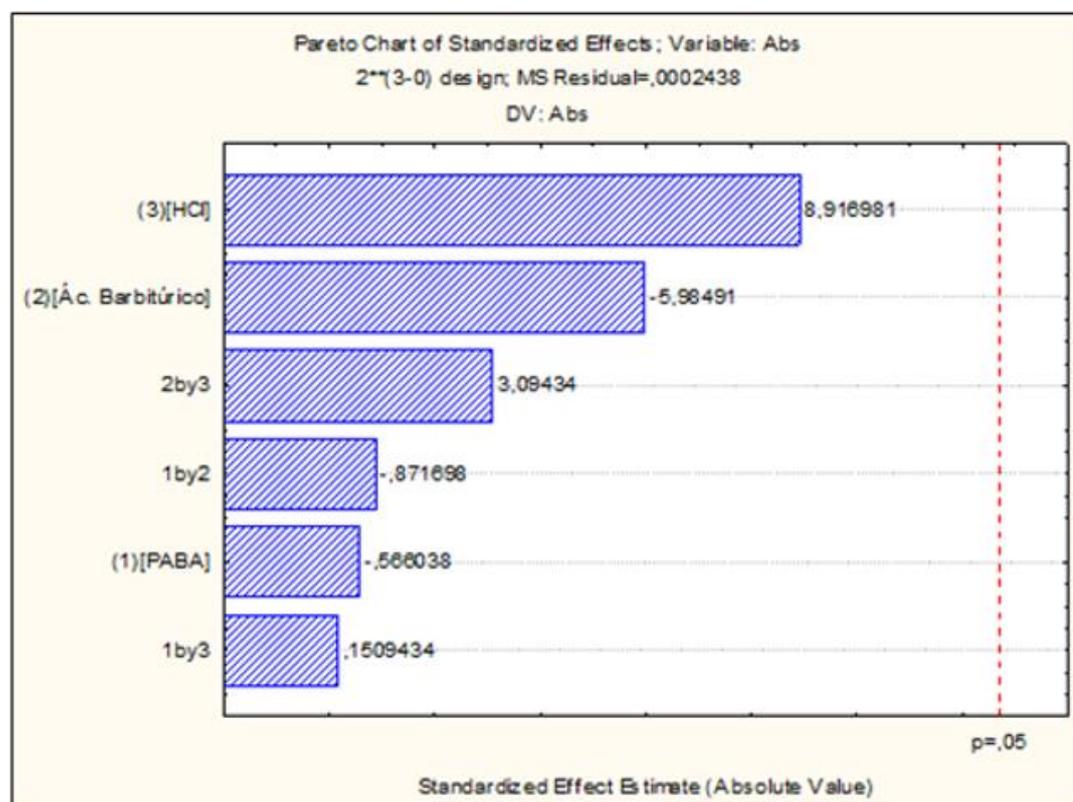


Figura 24 – Gráfico de Pareto para reação do PABA e AB com HMF

Pelo exposto, os fatores de maior influência na determinação do HMF são a concentração de AB e a concentração de HCl, já para a determinação do FUR os fatores de maior influência são a concentração de PABA e a concentração de HCl. Dentro do intervalo analisado, é possível considerar que as condições de análise para ambos os analitos estão otimizadas; entretanto, é feita a superfície de resposta de FUR e HMF para garantir que haja a maior resposta analítica possível, ou seja, que sejam encontradas as condições ideais de análise para determinação dos analitos.

Como mencionado anteriormente, a matriz do planejamento fatorial foi feita com auxílio do *software* Minitab 16. O tratamento estatístico dos dados obtidos através da realização dos experimentos foi feito com auxílio do *software* Statistica 7.

5.3.2 Superfície de resposta

Após a realização do planejamento fatorial para a reação do PABA e AB com FUR e HMF, foi construído o gráfico de uma superfície de resposta para cada uma das reações com o intuito de encontrar as condições ideais de análise. Para cada uma das superfícies de resposta foram utilizados os parâmetros de maior influência nas determinações dos analitos a partir dos dados encontrados pelo planejamento fatorial.

Para determinação do FUR, os parâmetros utilizados na construção da superfície de resposta foram a concentração de PABA e a concentração de H^+ . Já para determinação de HMF, os parâmetros utilizados na construção da superfície de resposta foram a concentração de AB e a concentração de H^+ .

Na tabela 10 a seguir, têm-se os resultados obtidos nos experimentos realizados para obtenção da superfície de resposta do tipo composto central para reação de PABA e AB com FUR:

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

[PABA] mol L ⁻¹	[H ⁺] mol L ⁻¹	A _R
0,015	0,005	0,103±0,005
0,045	0,005	0,082±0,007
0,015	0,025	0,222±0,004
0,045	0,025	0,230±0,003
0,009	0,015	0,157±0,004
0,051	0,015	0,131±0,005
0,030	0,001	0,046±0,004
0,030	0,029	0,236±0,009
0,030	0,015	0,181±0,009
0,030	0,015	0,169±0,004
0,030	0,015	0,174±0,007
0,030	0,015	0,165±0,013
0,030	0,015	0,162±0,008

Na figura 25 apresentada a seguir tem-se a superfície de resposta para reação do PABA e AB com FUR com seu respectivo gráfico de curvas de nível. Observa-se que foi possível estipular a concentração ideal de H⁺ na solução de reagente a ser utilizada, a qual foi definida como sendo 0,015 mol L⁻¹. No entanto, como pode ser visto na figura 25, não é possível atingir a concentração ideal de PABA, de maneira que, teoricamente, seria necessário aumentá-la a fim de se atingir o ponto de máximo na superfície; contudo, não é possível aumentar a concentração de PABA a esse nível, uma vez que há limitação quanto à sua solubilidade no meio reacional, sendo assim, foi estabelecido que o valor otimizado para concentração de PABA seria de aproximadamente 0,054 mol L⁻¹, sendo que essa é a maior concentração possível a ser utilizada, para que se obtenha uma resposta satisfatória.

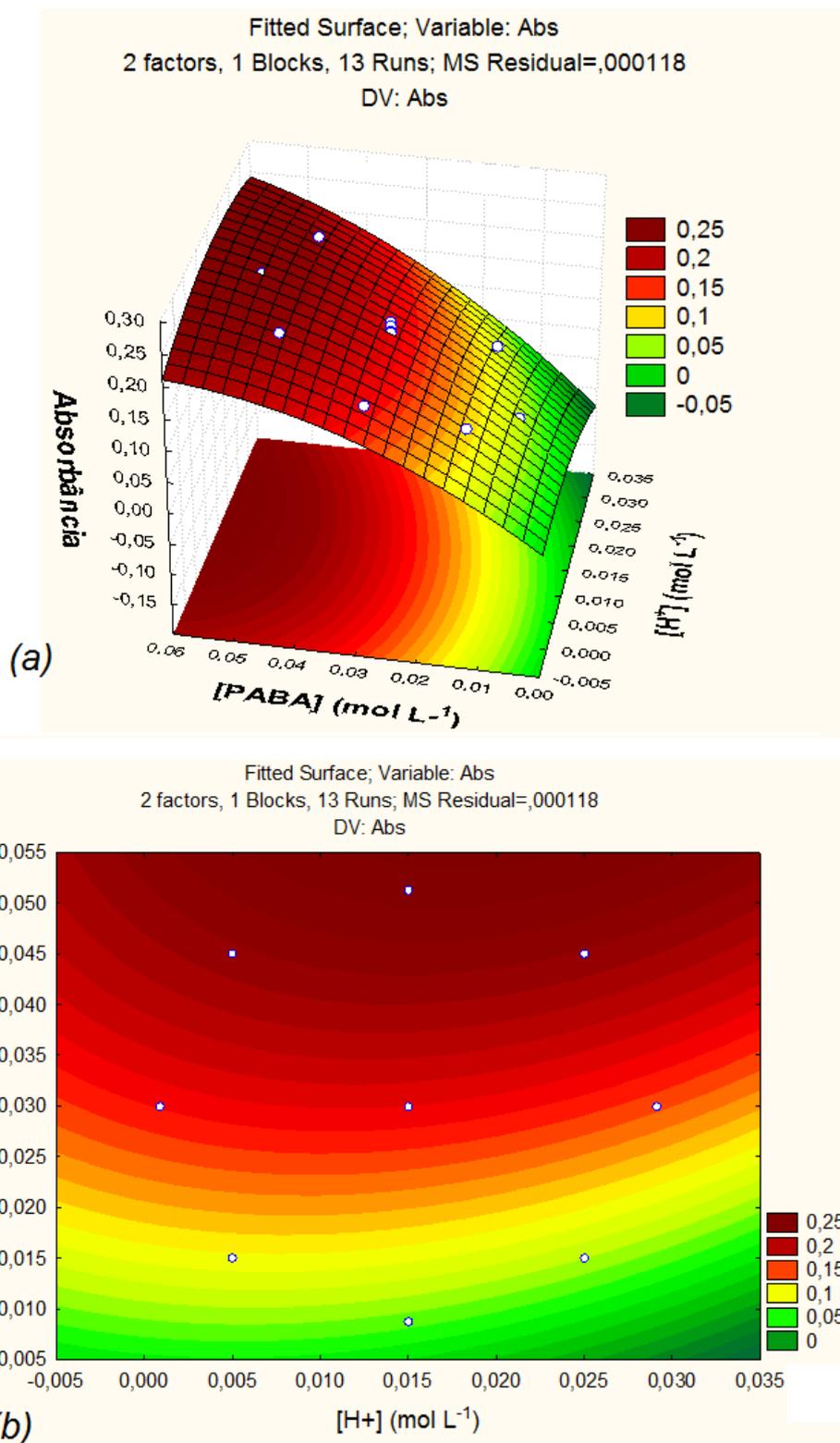


Figura 25 – Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) para reação com FUR

A equação que representa a superfície de resposta feita para a reação do FUR com PABA e AB pode ser encontrada a seguir (equação 5):

$$A_R = 0,005 + 0,625[H^+] - 89,083[H^+]^2 + 6,511[PABA] - 45,889[PABA]^2 + 47,222[H^+][PABA]$$

Equação 5

Na tabela 11 a seguir, tem-se os resultados obtidos nos experimentos realizados para obtenção da superfície de resposta do tipo composto central para reação de PABA e AB com HMF:

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

[AB] mol L ⁻¹	[H ⁺] mol L ⁻¹	A _R
0,005	0,100	0,256±0,009
0,020	0,100	0,203±0,009
0,005	0,500	0,297±0,005
0,020	0,500	0,283±0,012
0,002	0,300	0,286±0,012
0,023	0,300	0,273±0,007
0,013	0,017	0,162±0,013
0,013	0,583	0,317±0,008
0,013	0,300	0,309±0,004
0,013	0,300	0,309±0,008
0,013	0,300	0,315±0,010
0,013	0,300	0,327±0,012
0,013	0,300	0,314±0,012

É possível visualizar na figura 26 a superfície de resposta para a reação de PABA e AB com HMF com sua respectiva curva de nível. Diferentemente da superfície de resposta do FUR, neste caso foi possível estipular o ponto ótimo das condições de análise, no qual estão otimizadas as concentrações de H⁺ e AB com os respectivos valores de 0,27 mol L⁻¹ e 0,017 mol L⁻¹. Conforme visto no planejamento fatorial, uma menor concentração de PABA fornece uma maior resposta analítica, foi utilizada a menor concentração de PABA usada no planejamento fatorial (0,0109 mol L⁻¹).

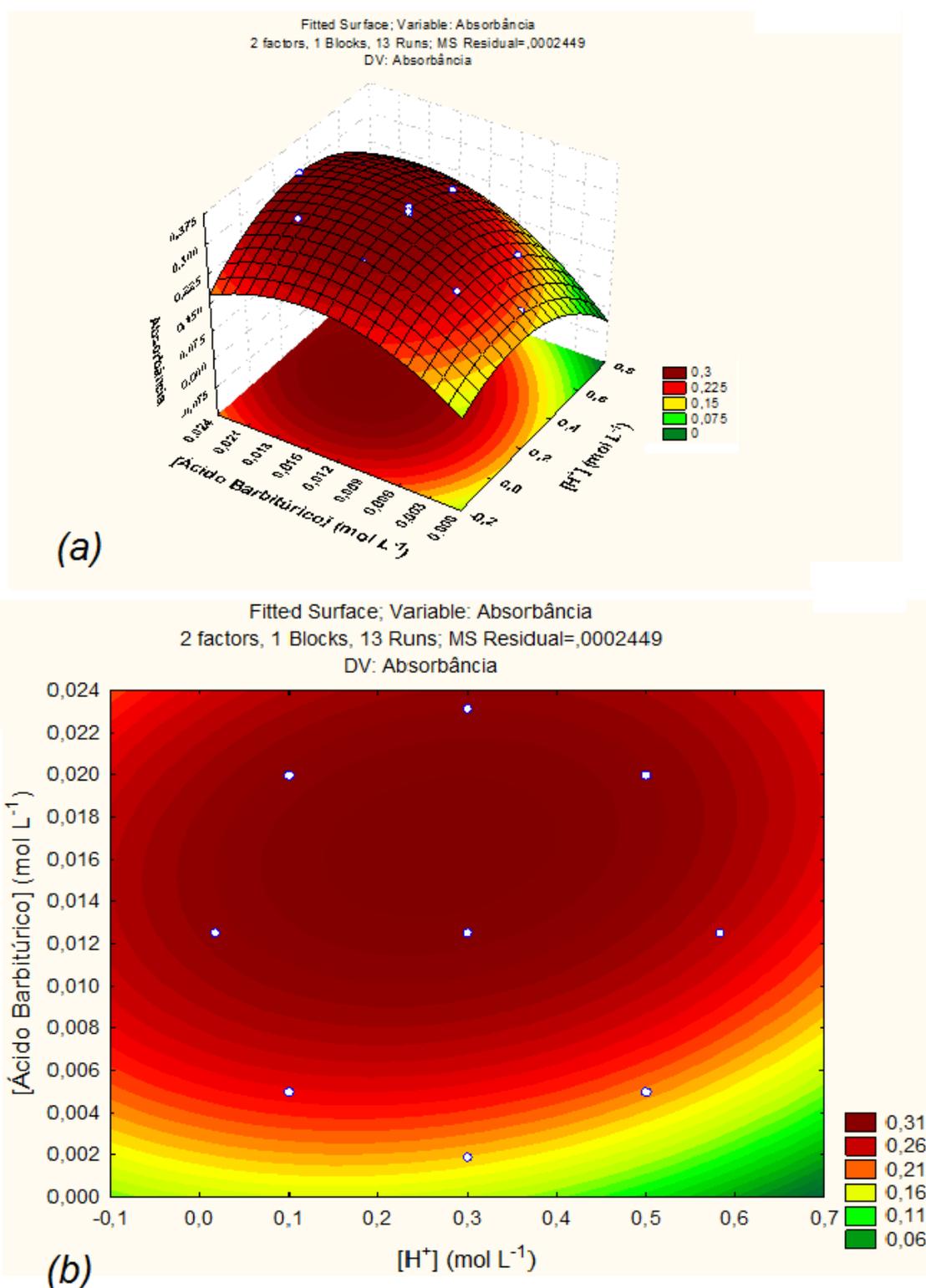


Figura 26 – Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) para reação com HMF

A equação que representa a superfície de resposta feita para a reação do HMF com PABA e AB pode ser encontrada a seguir (equação 6):

$$A_R = 0,141 + 0,119[H^+] - 0,439[H^+]^2 + 20,418[AB] - 667,926[AB]^2 + 6,500[H^+][AB]$$

Equação 6

Sendo assim, os valores otimizados das concentrações de PABA, AB e H+ para as determinações de FUR e HMF podem ser vistos na tabela 12 a seguir:

Tabela 12 – Parâmetros otimizados para determinação dos analitos

Fator (mol L⁻¹)	FUR	HMF
[PABA]	0,054	0,0109
[AB]	0,017	0,017
[H⁺]	0,015	0,270

5.3.3 Estabilidade do produto da reação

Após a etapa de otimização das condições experimentais, foi realizado o teste de estabilidade do produto formado pela reação do PABA e AB com HMF e FUR. Abaixo, tem-se a tabela com os resultados dos testes (tabela 13)

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

	HMF (50 mg L⁻¹)	FUR (25 mg L⁻¹)
Tempo (min)	A_R médio	A_R médio
1	0,346	0,210
2,5	0,349	0,227
5	0,332	0,247
7,5	0,326	0,256
10	0,329	0,264
15	0,314	0,272
20	0,306	0,277
25	0,309	0,280
30	0,299	0,281
40	0,302	0,281
50	0,301	0,278
60	0,297	0,275
75	0,300	0,269
90	0,323	0,262
105	0,325	0,257
120	0,323	0,248
150	0,323	0,236
180	0,324	0,223

Como pode ser visto nos gráficos a seguir (figura 27), é possível notar que os produtos de ambas as reações são estáveis a partir de 15 minutos depois de secos e, assim permanecem, até aproximadamente 120 minutos. Sendo assim, as leituras dos *spot-test* são realizadas 15 minutos após a secagem dos analitos, sendo que a secagem é feita à temperatura ambiente.

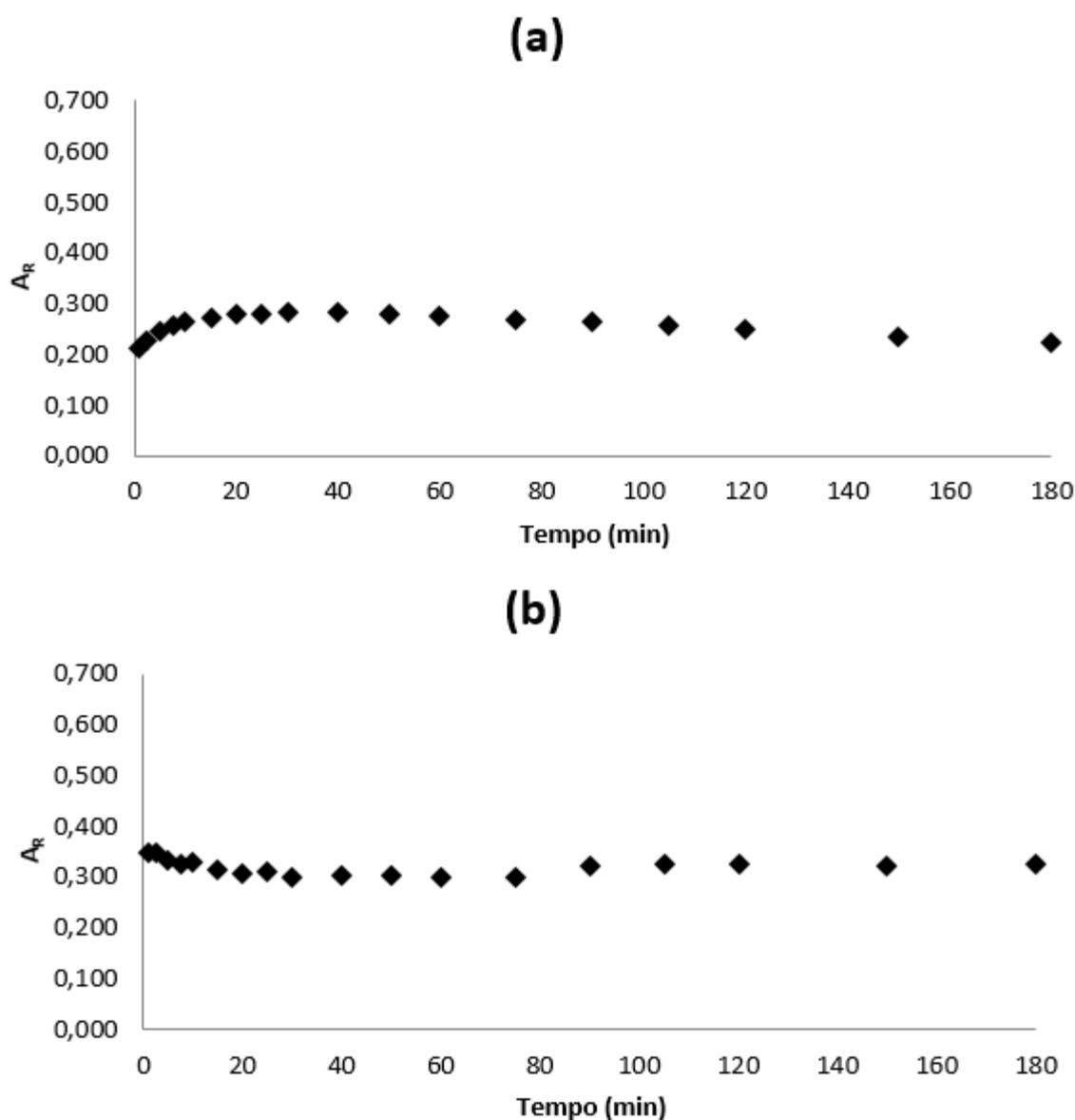


Figura 27 – Resultado do teste de estabilidade ótica para **(a)** FUR (25 mg L⁻¹) **(b)** HMF (50 mg L⁻¹).

5.4 Figuras de mérito

A seguir são apresentadas as figuras de mérito da metodologia proposta que incluem curva analítica, repetibilidade e limites de detecção e quantificação.

5.4.1 Curva analítica

Após a otimização de todas as condições experimentais, foram construídas as curvas analíticas para ambos os analitos. As concentrações das soluções padrão para a curva analítica do furfural variam de $8,69 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ até $4,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O gráfico resultante (figura 28) possui equação de regressão linear igual a $A_R = 1126,6 C_{\text{furfural}} + 0,0896$ e coeficiente de correlação (R) igual 0,967. Os pontos da curva representam a média de três replicatas.

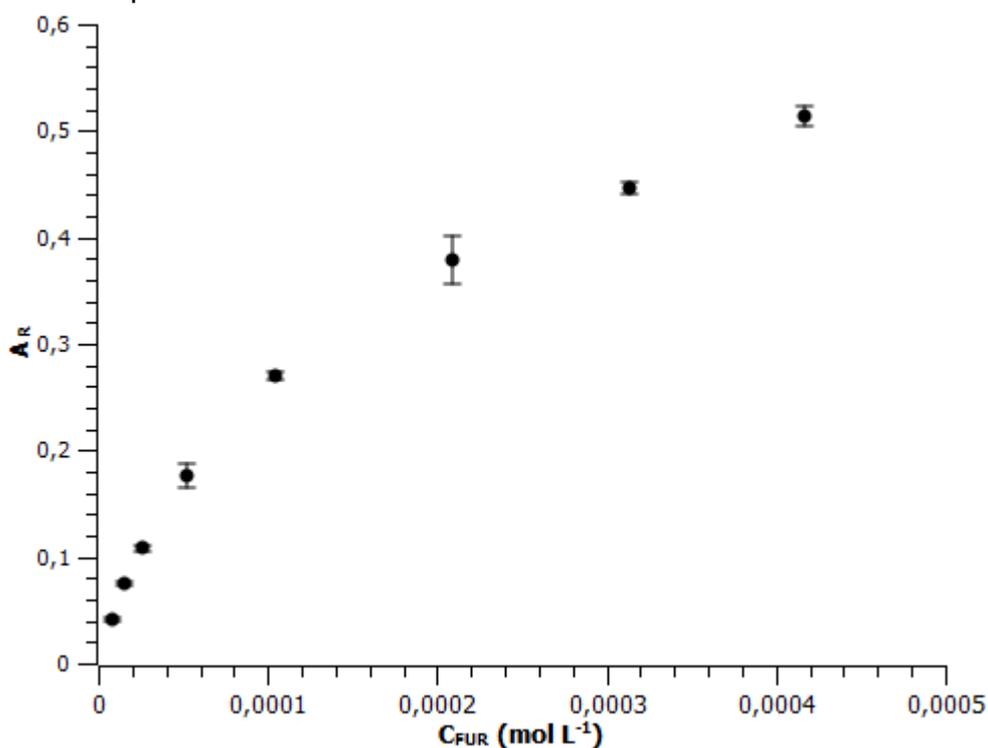


Figura 28– Curva analítica A_R em função da concentração de furfural. Equação de reta: $A_R = 1126,6 C_{\text{furfural}} + 0,0896$ e $R = 0,967$ e $n = 3$.

É nítido que a relação entre a A_R e a concentração de furfural não apresenta comportamento satisfatoriamente linear, sendo assim, a fim de melhorar a linearidade do método, foi traçado o gráfico da A_R em função da raiz quadrada da concentração (figura 29).

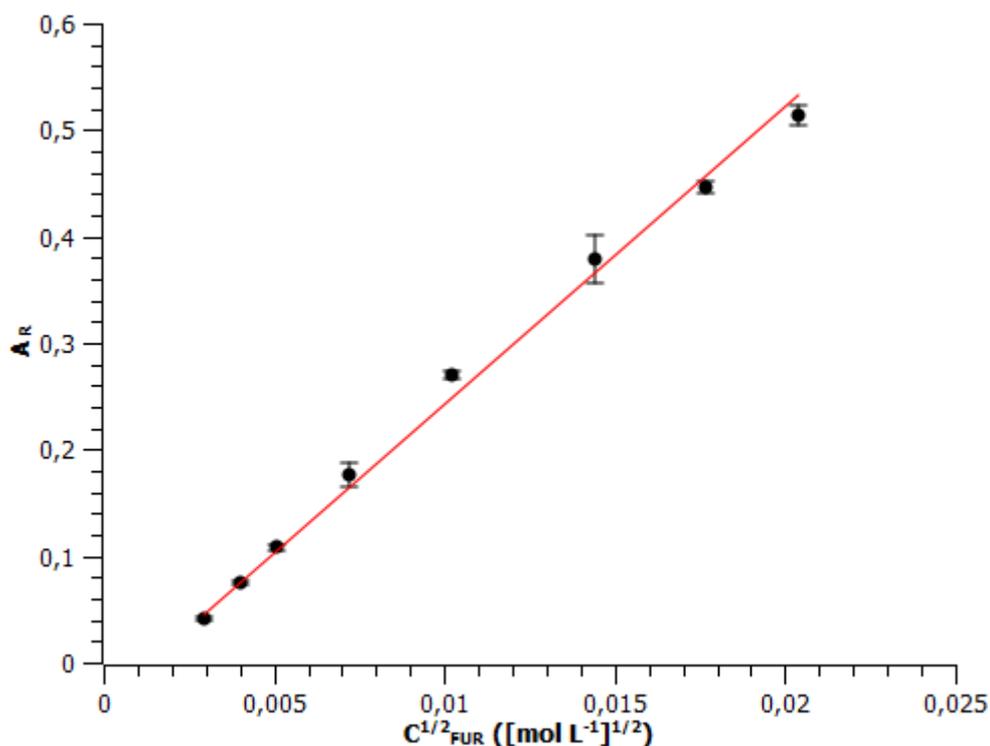


Figura 29 – Curva analítica A_R em função da raiz quadrada concentração de furfural.
Equação de reta: $A_R = 27,117 C^{1/2} - 0,0271$ e R 0,997 e $n=3$

Como pode ser visto na figura 29, a relação de A_R com $C^{1/2}$ é linear, comprovado pelo R igual a 0,997. Dessa maneira, a curva analítica para determinação de furfural será de A_R em função da raiz quadrada da concentração do analito.

Para a curva analítica do HMF, as concentrações de soluções padrão utilizadas foram de $1,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ até $7,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O gráfico resultante (figura 30) possui equação de regressão linear igual a $A_R = 490,64 C_{HMF} + 0,0618$ e coeficiente de correlação (R) 0,970.

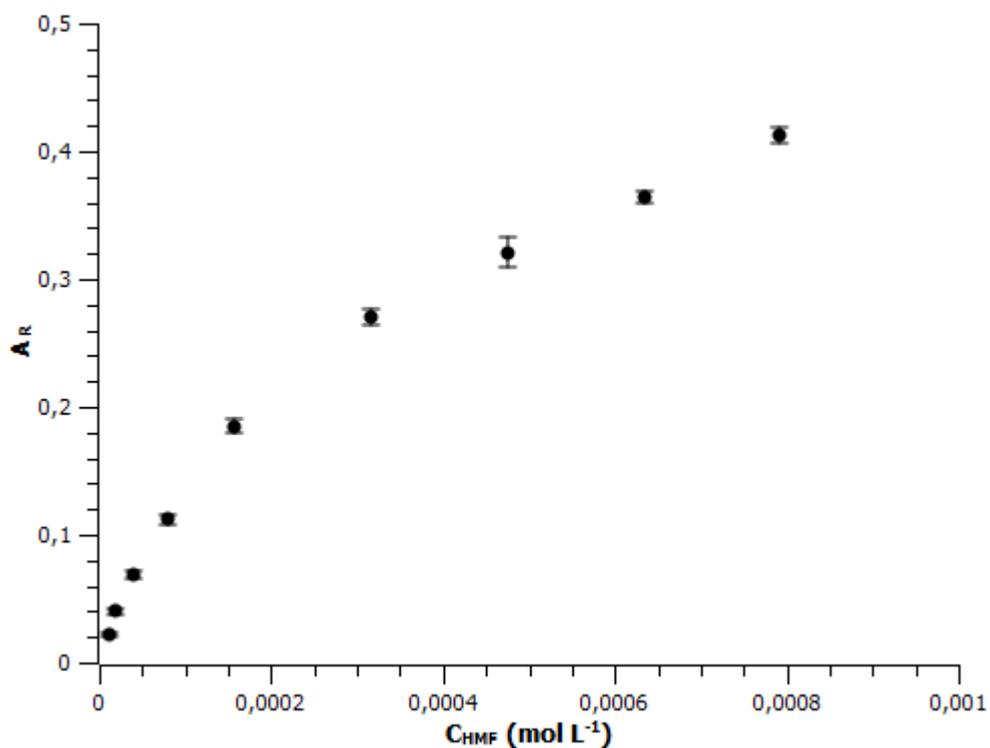


Figura 30 – Curva analítica A_R em função da concentração de HMF.
Equação de reta: $A_R = 490,64 C_{HMF} + 0,0618$ e $R = 0,970$ e $n=3$

Assim como o furfural, a relação entre A_R e a C_{HMF} não apresenta comportamento linear, dessa forma, foi adotado o mesmo procedimento, traçando um gráfico da A_R em função da raiz quadrada da concentração de HMF para que fosse obtida uma relação linear. A seguir, tem-se a curva de A_R em função da raiz quadrada da concentração de HMF (figura 31).

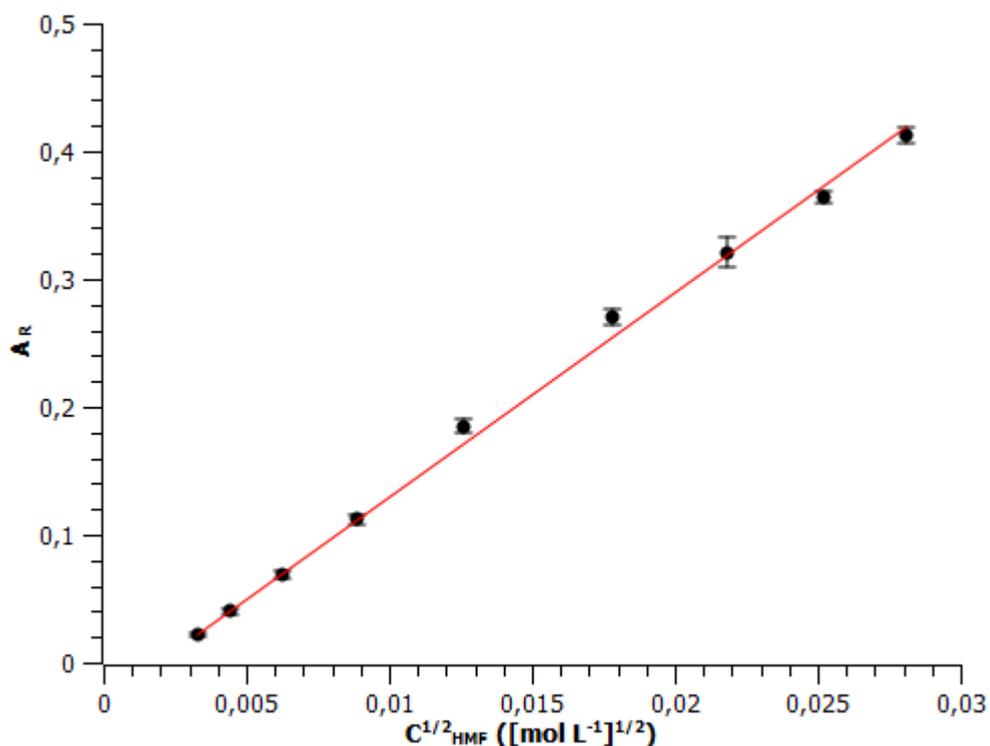


Figura 31 – Curva analítica A_R em função da raiz quadrada concentração de HMF. Equação de reta: $A_R = 15,822 C^{1/2} - 0,0263$ e $R = 0,998$ e $n=3$

Como pode ser visto na figura anterior, a relação de A_R com $C^{1/2}$ é linear, comprovado pelo R igual a 0,998. Dessa maneira, a curva analítica para determinação de HMF será de A_R em função da raiz quadrada da concentração do analito.

Como a legislação brasileira estabelece o limite para somatória de FUR e HMF na unidade de mg a cada 100 mL de etanol anidro, afim de facilitar a compreensão das curvas analíticas, cujas unidades de concentração estão em mol L^{-1} , a seguir seguem as tabelas (tabelas 14 e 15) com os valores de concentração nas unidades de mol L^{-1} , mg L^{-1} , bem como os valores da raiz quadrada da concentração, utilizados na construção de ambas as curvas analíticas.

Tabela 14 – Dados da curva analítica do FUR

Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração (mol L ⁻¹)	Raiz da concentração (mol L ⁻¹) ^{1/2}	A _R médio
0,84	8,69 x 10 ⁻⁶	2,95 x 10 ⁻³	0,041±0,002
1,53	1,59 x 10 ⁻⁵	3,99 x 10 ⁻³	0,08±0,03
2,51	2,61 x 10 ⁻⁵	5,11 x 10 ⁻³	0,11±0,03
5,01	5,22 x 10 ⁻⁵	7,22 x 10 ⁻³	0,18±0,06
10,02	1,04 x 10 ⁻⁴	1,02 x 10 ⁻²	0,27±0,02
20,04	2,09 x 10 ⁻⁴	1,44 x 10 ⁻²	0,38±0,06
30,07	3,13 x 10 ⁻⁴	1,77 x 10 ⁻²	0,45±0,01
40,09	4,17 x 10 ⁻⁴	2,04 x 10 ⁻²	0,51±0,02

Tabela 15 – Dados da curva analítica do HMF

Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração (mol L ⁻¹)	Raiz da concentração (mol L ⁻¹) ^{1/2}	A _R médio
1,39	1,10 x 10 ⁻⁵	3,32 x 10 ⁻³	0,022±0,001
2,49	1,98 x 10 ⁻⁵	4,45 x 10 ⁻³	0,040±0,002
4,99	3,96 x 10 ⁻⁵	6,29 x 10 ⁻³	0,069±0,003
9,98	7,91 x 10 ⁻⁵	8,90 x 10 ⁻³	0,112±0,004
19,96	1,58 x 10 ⁻⁴	1,26 x 10 ⁻²	0,185±0,005
39,92	3,17 x 10 ⁻⁴	1,78 x 10 ⁻²	0,270±0,007
60,01	4,76 x 10 ⁻⁴	2,18 x 10 ⁻²	0,32±0,01
79,97	6,34 x 10 ⁻⁴	2,52 x 10 ⁻²	0,364±0,005
99,79	7,91 x 10 ⁻⁴	2,81 x 10 ⁻²	0,413±0,006

5.4.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados conforme determinados pela IUPAC (THOMPSON, 2002) tomando a medida dos desvio-padrão (SD) de dez medidas do branco da reação conforme observado pelas equações a seguir (equações 7 e 8).

$$\frac{3 \times SD}{b} = LD$$

Equação 7

$$\frac{10 \times SD}{b} = LQ$$

Equação 8

Sendo que b representa o coeficiente angular da curva analítica. Os valores de LD e LQ para a reação de PABA e AB com FUR e com HMF encontram-se na tabela 16

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

FUR	mol L⁻¹	mg L⁻¹
LD	$6,93 \cdot 10^{-7}$	0,067
LQ	$7,70 \cdot 10^{-6}$	0,740
HMF	mol L⁻¹	mg L⁻¹
LD	$9,03 \cdot 10^{-6}$	0,114
LQ	$1,00 \cdot 10^{-5}$	1,27

5.4.3 Repetibilidade

Tendo sido construídas as curvas analíticas para FUR e HMF, foi avaliada a repetibilidade da metodologia através de medidas no mesmo dia e em dias diferentes. A seguir, têm-se as tabelas com os resultados das repetibilidades intradia e interdia (tabelas 17 e 18).

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

Furfural			
<i>Intradia</i>			
Concentração (mg L ⁻¹)	A _R média Manhã	A _R média Tarde	Desvio (%)
5,01	0,181	0,173	3,7
20,04	0,390	0,383	2,9
40,01	0,458	0,465	1,8
<i>Interdia</i>			
Concentração (mg L ⁻¹)	A _R média 05/03/2015	A _R média 10/03/2015	Desvio (%)
5,01	0,130	0,132	3,4
20,04	0,398	0,409	2,9
40,01	0,444	0,451	1,1

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

HMF			
<i>Intradia</i>			
Concentração (mg L ⁻¹)	A _R média Manhã	A _R média Tarde	Desvio (%)
5,08	0,049	0,047	3,2
20,30	0,167	0,168	1,6
60,04	0,314	0,315	2,4
<i>Interdia</i>			
Concentração (mg L ⁻¹)	A _R média 05/03/2015	A _R média 10/03/2015	Desvio (%)
5,08	0,061	0,056	5,5
20,30	0,159	0,177	6,4
60,04	0,315	0,313	2,6

Pelos resultados apresentados é possível afirmar que o método proposto pode ser considerado repetitivo, uma vez que, os testes realizados apresentaram desvios não superiores a 6,5%.

5.5 Validação da metodologia proposta

A validação da metodologia proposta se dá por meio da aplicação da mesma em amostras de cachaça, por testes de interferência da matriz e também pela comparação estatística dos resultados obtidos pelo método desenvolvido com os resultados obtidos através de uma metodologia já descrita na literatura.

5.5.1 Adição de padrão e recuperação

Para avaliar a interferência da matriz na determinação dos analitos, foram realizados testes de adição de padrão e recuperação que consistem em fortificar a matriz com quantidades conhecidas de padrão e, ao término das análises, é calculada a quantidade de padrão que se recupera.

No presente trabalho foram utilizados dois tipos de matriz para avaliação dos interferentes: cachaça envelhecida e não adoçada e cachaça adoçada não envelhecida. Em cada uma delas foram feitas fortificações variando de 50% até 250% de cada um dos analitos determinados.

A matriz de cachaça adoçada não envelhecida foi testada a fim de verificar se a presença de açúcares no meio reacional poderia interferir nas análises. Abaixo pode-se ver o resultado dos testes de adição de padrão e recuperação para o furfural e o HMF com fortificação de 50 a 250% de cada padrão (tabelas 19 e 20).

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

%	Concentração adicionada (mol L ⁻¹)	Concentração encontrada (mol L ⁻¹)	% Recuperação
50	1,04 x 10 ⁻⁴	1,11 x 10 ⁻⁴	106%
100	2,08 x 10 ⁻⁴	2,16 x 10 ⁻⁴	104%
150	2,60 x 10 ⁻⁴	2,59 x 10 ⁻⁴	99,5%
200	3,12 x 10 ⁻⁴	2,94 x 10 ⁻⁴	94,2%
250	3,64 x 10 ⁻⁴	3,26 x 10 ⁻⁴	89,5%

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

%	Concentração adicionada (mol L ⁻¹)	Concentração encontrada (mol L ⁻¹)	% Recuperação
50	7,91 x 10 ⁻⁵	7,94 x 10 ⁻⁴	100%
100	1,59 x 10 ⁻⁴	1,68 x 10 ⁻⁴	105%
150	1,99 x 10 ⁻⁴	2,03 x 10 ⁻⁴	102%
200	2,38 x 10 ⁻⁴	2,44 x 10 ⁻⁴	102%
250	2,78 x 10 ⁻⁴	2,95 x 10 ⁻⁴	106%

Os ensaios de adição de padrão e recuperação foram realizados em cachaças não adoçadas envelhecidas em toneis de carvalho para averiguar se o contato prolongado com a madeira, que gera a coloração amarelada nesse tipo de amostra, pode ocasionar interferência significativa na análise de FUR e HMF. A seguir, encontram-se as tabelas com os resultados para os testes de adição de padrão e recuperação para ambos os analitos (tabelas 21 e 22).

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

%	Concentração adicionada (mol L ⁻¹)	Concentração encontrada (mol L ⁻¹)	% Recuperação
50	1,04 x 10 ⁻⁴	1,13 x 10 ⁻⁴	108%
100	2,08 x 10 ⁻⁴	2,25 x 10 ⁻⁴	108%
150	2,60 x 10 ⁻⁴	2,55 x 10 ⁻⁴	97,8%
200	3,12 x 10 ⁻⁴	3,07 x 10 ⁻⁴	98,4%
250	3,64 x 10 ⁻⁴	3,39 x 10 ⁻⁴	93,0%

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

%	Concentração adicionada (mol L ⁻¹)	Concentração encontrada (mol L ⁻¹)	% Recuperação
50	1,04 x 10 ⁻⁴	1,08 x 10 ⁻⁴	104%
100	2,08 x 10 ⁻⁴	2,02 x 10 ⁻⁴	96,9%
150	2,60 x 10 ⁻⁴	2,72 x 10 ⁻⁴	104%
200	3,12 x 10 ⁻⁴	3,18 x 10 ⁻⁴	102%
250	3,64 x 10 ⁻⁴	3,51 x 10 ⁻⁴	96,3%

Por meio dos resultados apresentados é possível afirmar que nenhum dos dois tipos de matrizes analisadas interfere de maneira significativa na determinação de FUR e HMF, uma vez que todos os resultados encontrados para as recuperações estão dentro da faixa estipulada de 80-110% para a concentração máxima permitida dos analitos na amostra (HUBER, 1998).

5.5.2 *Aplicação da metodologia proposta em amostras de cachaça*

Após o desenvolvimento da metodologia, a mesma foi aplicada em amostras de cachaça provenientes de diversas partes do estado de São Paulo, bem como amostras provenientes de fora do estado.

As amostras de cachaça analisadas possuem diferentes teores alcoólicos e características diversas. Foram selecionadas 11 amostras distintas que tem suas características descritas na tabela 23 a seguir:

Tabela 23 – Amostras de cachaças analisadas no presente trabalho

Amostra	Característica	Teor Alcoólico (% v/v)	Proveniência
A	Não adoçada	45	Brotas – SP
B	Adoçada	39	Pirassununga – SP
C	Adoçada	39	Sta. Rita Passa Quatro – SP
D	Adoçada	39	Pirassununga – SP
E	Não adoçada	38	Sorocaba – SP
F	Adoçada	39	Rio Claro – SP
G	Envelhecida e não adoçada	39	Jundiaí – SP
H	Envelhecida e não adoçada	45	Brotas – SP
I	Adoçada	39	Jandaia do Sul – PR
J	Adoçada	40	Vitória de Sto. Antônio – PE
K	Não adoçada	38	Fortaleza – CE

As amostras anteriormente descritas foram submetidas a metodologia desenvolvida não sendo necessárias etapas de *clean-up*. Sendo assim, era aplicada a solução de reagente para cada um dos analitos em papeis com área delimitada e em seguida, sem que o reagente estivesse completamente seco, a amostra era aplicada sobre ele. Depois de 15 minutos que os *spot-test* estivessem completamente secos eram feitas as leituras de A_R no equipamento.

Os analitos eram determinados separadamente e, ao término dos experimentos, tinham suas quantidades somadas a fim de determinar se o valor encontrado ultrapassava ou não o limite estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL..., 2005).

Os resultados encontrados são apresentados nas tabelas a seguir (tabelas 24, 25 e 26):

Tabela 24 – Determinação de HMF em amostras de cachaça³

Amostra	Concentração HMF (mg/100 mL de EtOH)
A	<LQ
B	0,18 ± 0,02
C	0,28 ± 0,04
D	<LQ
E	<LQ
F	0,20 ± 0,02
G	6,7 ± 0,1
H	<LQ
I	0,32 ± 0,04
J	<LQ
K	<LQ

Tabela 25 – Determinação de FUR em amostras de cachaça

Amostra	Concentração FUR (mg/100 mL de EtOH)
A	0,137 ± 0,009
B	<LQ
C	<LQ
D	<LQ
E	<LQ
F	<LQ
G	0,130 ± 0,009
H	0,35 ± 0,02
I	<LQ
J	<LQ
K	<LQ

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

Amostra	Concentração FUR + HMF (mg/100 mL de EtOH)
A	0,137 ± 0,009
B	0,18 ± 0,02
C	0,28 ± 0,04
D	<LQ
E	<LQ
F	0,20 ± 0,03
G	6,8 ± 0,1
H	0,35 ± 0,02
I	0,32 ± 0,04
J	<LQ
K	<LQ

³ As determinações nas tabelas 23, 24 e 25 são a média de três replicatas.

Nota-se que uma série de amostras não possuem os valores de FUR e HMF quantificados pois suas concentrações encontram-se abaixo do LQ da metodologia proposta. Entretanto, é possível afirmar que nenhuma delas está acima do limite máximo estipulado pela legislação, uma vez que se HMF está abaixo do LQ e FUR também está abaixo do LQ, a somatória de ambos os analitos, conseqüentemente, será menor que os 5 mg/100mL de etanol anidro e também estará abaixo do limite já que LQ para HMF é de $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,27 \text{ mg L}^{-1}$) e o LQ para o FUR é de $7,70 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,74 \text{ mg L}^{-1}$).

5.5.3 Metodologia comparativa

Por fim, para completar a validação da metodologia proposta, deu-se início à comparação dos resultados obtidos pela metodologia proposta com aqueles obtidos através de uma metodologia previamente descrita na literatura.

A metodologia escolhida foi a descrita em Alcázar (2006); utilizando a técnica cromatográfica tendo como fase móvel uma mistura composta por um solvente aquoso (solução ácida descrita no item 3.3) e um solvente orgânico (acetonitrila).

Conforme consta na literatura (ALCÁZAR, 2006), sob as condições cromatográficas descritas anteriormente na tabela 5, os tempos de retenção (t_R) são de aproximadamente 3,1 minutos para o HMF, enquanto para FUR t_R está em torno de 5 minutos.

Como é possível visualizar no cromatograma (figura 32) abaixo, há uma pequena variação nos tempos de retenção para o padrão de cada uma das substâncias. Isso pode ocorrer dado que não foi utilizado o mesmo equipamento cromatográfico, bem como coluna de marca diferente àquela descrita pela metodologia comparativa, sendo utilizados equipamentos equivalentes. Nota-se o t_R para o HMF está em torno de 3,4 minutos, enquanto t_R para o FUR está em torno de 5,8 minutos.

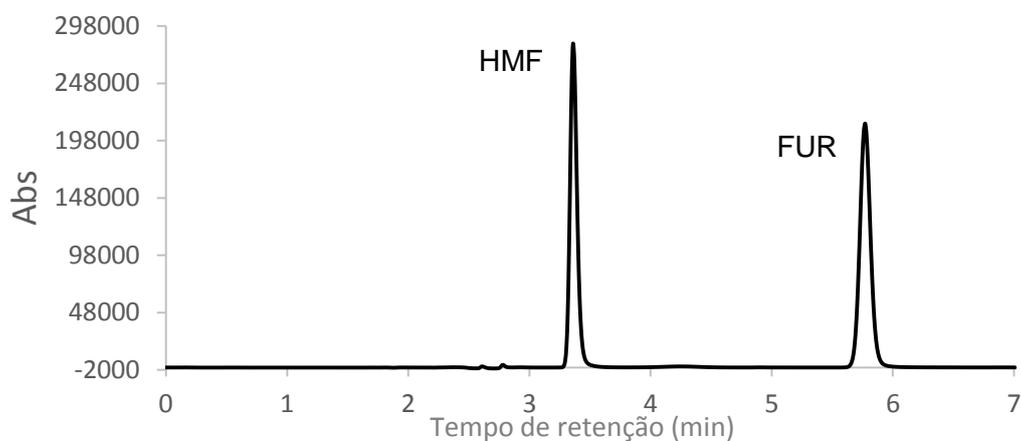


Figura 32 – Cromatograma obtido da mistura dos padrões de FUR com t_R 5,8 min (Conc = 25 mg L⁻¹) e HMF com t_R 3,4 min (Conc = 25 mg L⁻¹)

Foi então traçada uma curva analítica para cada um dos analitos com faixa linear de 0,1 a 50 mg L⁻¹ que podem ser vistas nas figuras 33 e 34 a seguir:

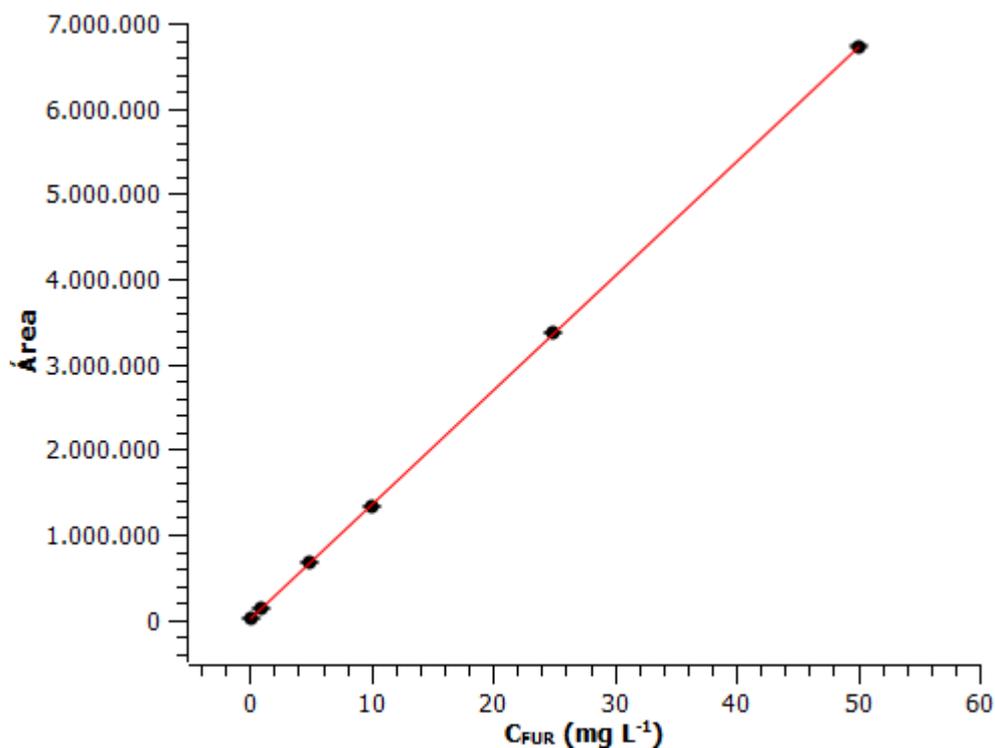


Figura 33 – Curva analítica da Área em função da C_{FUR} (mg L⁻¹).
Equação de reta Área = 134600,86Conc – 4712,52 com R = 0,99999

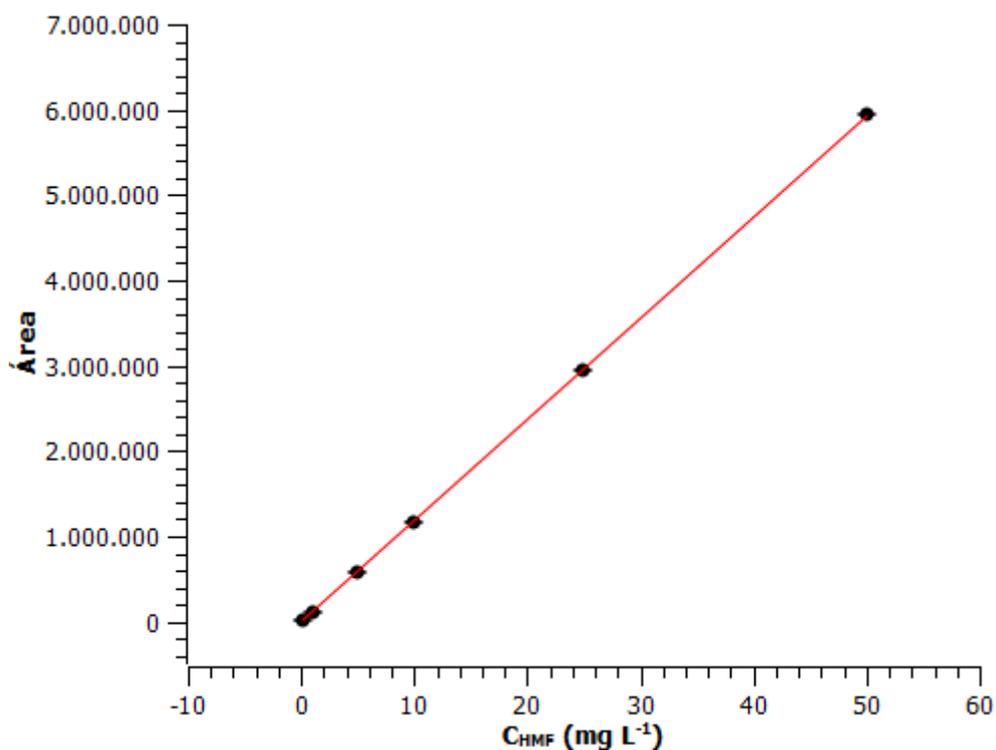


Figura 34 – Curva analítica da Área em função da C_{HMF} (mg L⁻¹).
Equação de reta Área = 118762,21Conc – 9532,23 com R = 0,99998

As amostras foram analisadas por esta mesma metodologia cromatográfica. A seguir, na figura 35, é possível visualizar um exemplo de um cromatograma da amostra F, no qual pode-se identificar nitidamente os picos de HMF e FUR por seus tempos de retenção característicos, em torno de 3,3 minutos e 5,5 minutos, respectivamente

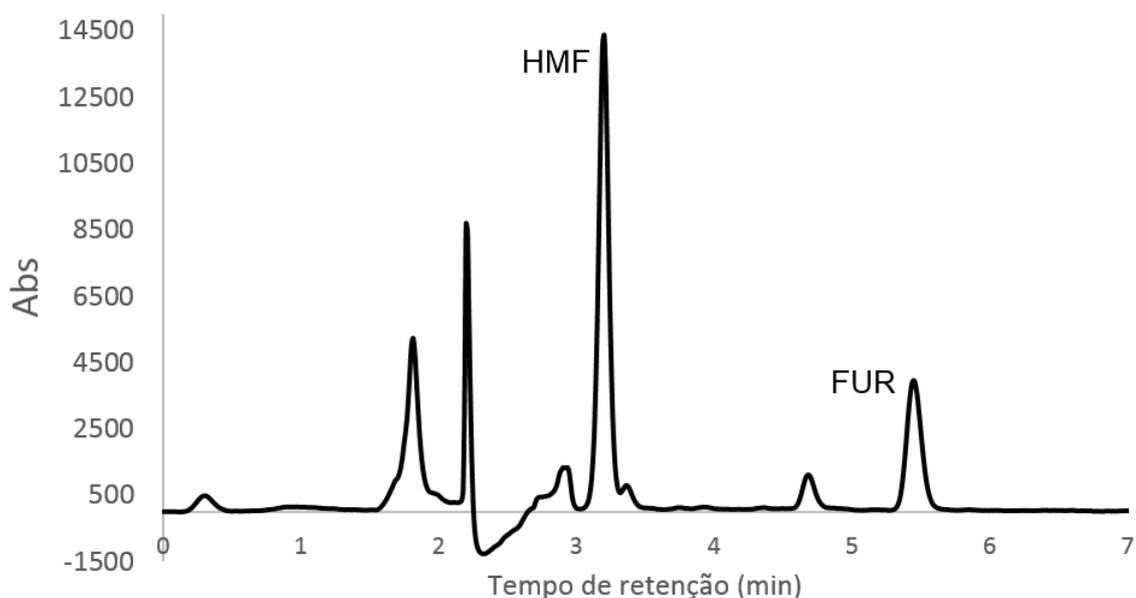


Figura 35 – Cromatograma referente a amostra F

A seguir, nas tabelas 27, 28 e 29, tem-se o resultado das determinações de FUR e HMF em amostras de cachaça pela metodologia comparativa:

Tabela 27 – Determinação de HMF em amostras de cachaça pela metodologia comparativa⁴

Amostra	Concentração HMF (mg/100 mL de EtOH)
A	<LQ
B	0,215 ± 0,000
C	0,275 ± 0,001
D	<LQ
E	<LQ
F	0,178 ± 0,000
G	6,77 ± 0,02
H	0,062 ± 0,000
I	0,362 ± 0,001
J	<LQ
K	<LQ

⁴ As determinações nas tabelas 27, 28 e 29 são a média de três replicatas.

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

Amostra	Concentração FUR (mg/100 mL de EtOH)
A	0,139 ± 0,000
B	<LQ
C	<LQ
D	<LQ
E	<LQ
F	0,057 ± 0,000
G	0,12 ± 0,03
H	0,386 ± 0,003
I	<LQ
J	<LQ
K	<LQ

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

Amostra	Concentração FUR + HMF (mg/100 mL de EtOH)
A	0,139 ± 0,000
B	0,215 ± 0,000
C	0,275 ± 0,001
D	<LQ
E	<LQ
F	0,235 ± 0,000
G	6,889 ± 0,003
H	0,449 ± 0,003
I	0,362 ± 0,001
J	<LQ
K	<LQ

5.5.4 Comparação dos resultados obtidos

Ao término da determinação dos analitos pela metodologia comparativa, deu-se início às comparações das médias obtidas pela metodologia proposta e a metodologia comparativa por meio do teste estatístico de t de Student, no qual será verificado se ambas as médias obtidas são estatisticamente equivalentes.

Como foram realizadas três replicatas para cada uma das determinações realizadas, o valor tabelado do t de Student é 4,303⁵ (teste t pareado). Para que um

⁵ Para dois graus de liberdade e intervalo de confiança de 95%

valor seja considerado estatisticamente equivalente a outro, o teste t de Student deve apresentar, em módulo, valor igual ou inferior ao valor tabelado.

Nas tabelas 30 e 31 a seguir tem-se a comparação entre as médias obtidas em cada uma das metodologias para determinação de HMF e FUR.

Tabela 30 – teste t de Student para determinação de HMF em amostras de cachaça⁶

t_{tabelado} 4,303	Método comparativo	Método proposto	t_{calculado}
Amostra	Concentração (mg/100 mL EtOH anidro)	Concentração (mg/100 mL EtOH anidro)	
A	<LQ ^a	<LQ ^b	-
B	0,215 ± 0,000	0,180 ± 0,017	3,566
C	0,275 ± 0,001	0,282 ± 0,039	0,282
D	<LQ	<LQ	-
E	<LQ	<LQ	-
F	0,178 ± 0,000	0,197 ± 0,025	1,304
G	6,768 ± 0,023	6,694 ± 0,122	0,926
H	0,062 ± 0,000	<LQ	-
I	0,362 ± 0,001	0,319 ± 0,036	2,029
J	<LQ	<LQ	-
K	<LQ	<LQ	-

^a 1,27 mg L⁻¹

^b 0,1 mg L⁻¹

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

t_{tabelado} 4,303	Método comparativo	Método proposto	t_{calculado}
Amostra	Concentração (mg/100 mL EtOH anidro)	Concentração (mg/100 mL EtOH anidro)	
A	0,139 ± 0,000	0,137 ± 0,009	1,102
B	<LQ ^a	<LQ ^b	-
C	<LQ	<LQ	-
D	<LQ	<LQ	-
E	<LQ	<LQ	-
F	0,057 ± 0,000	<LQ	-
G	0,121 ± 0,030	0,130 ± 0,009	0,329
H	0,386 ± 0,003	0,347 ± 0,018	2,937
I	<LQ	<LQ	-
J	<LQ	<LQ	-
K	<LQ	<LQ	-

^a 0,74 mg L⁻¹

^b 0,1 mg L⁻¹

⁶ Média de 3 determinações nas tabelas 30 e 31

Como pode ser visto nas duas tabelas anteriores, os valores de t calculado são, em módulo, menores que os valores de t tabelado; dessa maneira, é possível afirmar que as quantidades de HMF e FUR encontradas pela metodologia comparativa e pela metodologia proposta não diferem de maneira significativa entre si.

Na tabela 32 é apresentada uma comparação dos valores encontrados para somatória de HMF e FUR em ambas as metodologias.

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

Amostra	Método comparativo	Método proposto
	Concentração (mg/100 mL EtOH anidro)	Concentração (mg/100 mL EtOH anidro)
A	0,139 ± 0,000	0,137 ± 0,009
B	0,215 ± 0,000	0,180 ± 0,017
C	0,275 ± 0,001	0,282 ± 0,039
D	<LQ	<LQ
E	<LQ	<LQ
F	0,235 ± 0,000	0,197 ± 0,025
G	6,889 ± 0,003	6,823 ± 0,131
H	0,449 ± 0,003	0,347 ± 0,018
I	0,362 ± 0,001	0,319 ± 0,036
J	<LQ	<LQ
K	<LQ	<LQ

Como é possível observar na tabela anterior, os resultados encontrados pela metodologia proposta são próximos daqueles encontrados pela metodologia cromatográfica comparativa.

Entretanto, a nova metodologia aqui descrita não utiliza de solventes orgânicos tóxicos, como ACN, a qual é utilizada no o método comparativo. Além disso, os equipamentos utilizados na nova metodologia são significativamente mais baratos e não necessita de operador especializado como no equipamento cromatográfico utilizado na metodologia comparativa.

A título de comparação, na tabela 33 é apresentada um comparativo dos parâmetros entre as duas metodologias empregadas, no qual estão presentes a demanda de tempo em cada análise e também um cálculo aproximado do valor necessário para realizar cada determinação. Na tabela não foi considerado o custo da mão de obra do operador.

Tabela 33 – Comparação entre as metodologias proposta e HPLC

Parâmetro	Custo Método proposto	Custo Método comparativo (ALCÁZAR, 2006)
Solvente ^a	Água deionizada	Análise: FM Solução A/ACN 18:82 (R\$ 0,06) Limpeza e acondicionamento equipamento: FM (R\$ 3,78)
Reagente FUR	<R\$ 0,01/análise	-
Reagente HMF	<R\$ 0,01/análise	-
Papel	R\$ 0,10/dispositivo	-
Tinta sólida (cera)	<R\$ 0,01/dispositivo	-
Equipamento ^b	Espectrômetro portátil Ocean Optics US\$4520,00 impressora de cera (R\$ ~4.600,00)	HPLC – DAD (US\$ ~150.000,00) + Coluna C18 (R\$ ~3.000,00) + filtro de seringa (R\$ 7,08)
Custo por análise ^c	R\$ 0,11	R\$ 7,14 + limpeza e acondicionamento
Tempo de análise	Entre aplicação, secagem e medição 20 min por análise	7 min por análise + 10 min de purga e 30 min para limpeza

^a Não incluso o custo de água deionizada.

^b Não incluso o custo de computador para o tratamento dos dados dos dois métodos.

^c Não incluso o custo do equipamento.

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.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como observado anteriormente, a metodologia de análise desenvolvida é eficaz na determinação de furfural e hidroximetilfurfural em amostras de cachaça. Contudo, a metodologia aqui proposta não se limita somente a esse tipo de amostra. Futuramente, pretende-se explorar a potencialidade deste método para determinação de furfural e hidroximetilfurfural em outros tipos de bebidas alcoólicas destiladas, como rum, whisky, gim, entre outros; ou mesmo em outros tipos de amostras, como por exemplo, biomassa.

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-furaldehyde 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 baking 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 practice**. 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 biomass**. 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](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 damage 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-damaging 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. Paper-based analytical device for electrochemical flow-injection analysis of glucose in urine. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 4174-4182, 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 Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 355-400, 1979.

MAIA, A. B. R. Componentes secundários da aguardente. **STAB: Açúcar, Alcool 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 piezoelectric 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 damage markers in baby foods: ascorbic acid, dehydroascorbic acid, hydroxymethylfurfural and furfural. **Journal 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 applied 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 aqueous 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.; GALLEN, 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.