



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Um Método Espectrofotométrico para
Quantificação de Furfural em Cachaças por
Extração Líquido-Líquido

Erika Maria Gouveia de Melo

João Pessoa – PB – Brasil

Março/2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Um Método Espectrofotométrico para
Quantificação de Furfural em Cachaças por
Extração Líquido-Líquido**

**Erika Maria Gouveia de
Melo***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração de Química Analítica

1º Orientador: Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida

2º Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima

*** Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**

João Pessoa – PB – Brasil

Março/2014

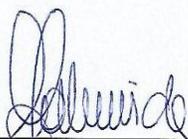
M528d Melo, Erika Maria Gouveia de.
Um método espectrofotométrico para quantificação de
furfural em cachaças por extração líquido-líquido / Erika Maria
Gouveia de Melo.-- João Pessoa, 2014.
78f. : il.
Orientadores: Luciano Farias de Almeida, Ricardo
Alexandre Cavalcanti de Lima
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Química analítica. 2. Extração líquido-líquido. 3. Furfural.
4. Cachaças.

UFPB/BC

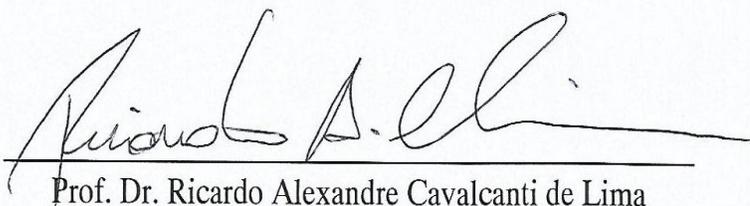
CDU: 543(043)

Um método espectrofotométrico para quantificação de furfural em cachaças por extração líquido-líquido.

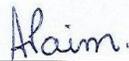
Dissertação de Mestrado de Erika Maria Gouveia de Melo aprovada pela banca examinadora em 21 de março de 2014:



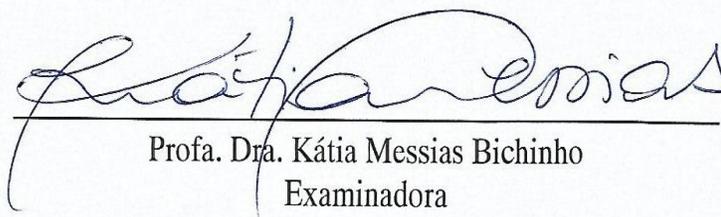
Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima
2º. Orientador



Prof. Dra. Ana Paula Silveira Paim
Examinadora



Prof. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora

“Cristo, em que estão
escondidos todos os tesouros da
sabedoria e da ciência”.

Bíblia Sagrada

Colossenses 2. 3

A Deus e a minha família.
Dedico.

Agradecimentos

À Deus;

Aos meus pais, Cícera Silva e José Erivaldo Gouveia e a minha prima Deisiane Rodrigues por todo o incentivo, carinho e amor;

Ao meu namorado, Eudo Augusto de Luna Lucena pela paciência, incentivo, colaboração, carinho e amor durante todo esse tempo;

Ao professor Luciano Farias de Almeida e Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima pela orientação, paciência, incentivo, colaboração e amizade;

A amiga e companheira de pesquisa, Jessica Lira, pela preocupação, paciência e grande ajuda na realização dos experimentos;

A professora Kátia Messias Bichinho pelas ricas contribuições na pré-defesa;

A professora Neide Queiroz pela participação e comentários na pré-defesa;

A professora Ana Paula Silveira Paim pela participação, gentileza e ricas contribuições na banca.

Ao LAQA, na pessoa do professor Mário Ugulino;

A todos os demais membros do LAQA, meu carinho.

Sumário

Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
Lista de siglas e abreviaturas	xiii
Resumo.....	xv
Abstract	xvi
Capítulo 1	1
1.Introdução.....	1
1.1 Caracterização do problema.....	2
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Geral.....	3
1.2.2 Específicos.....	3
Capítulo 2	4
2. Revisão bibliográfica	4
2.1 Cachaças.....	5
2.2 Cana- de- açúcar.....	10
2.3 Furan-2-carbaldeído.....	12
2.4 5-Hidroximetil-2-furaldeído.....	13
2.5 Formação do furfural e HMF na produção de bebidas.....	14
2.6 Métodos de referência para determinação de furfural em bebidas.....	18
2.7 Metodologias para determinação de furfural e HMF em bebidas.....	19
2.7.1 Métodos Espectrofotométricos	19
2.7.2 Cromatografia Gasosa	20
2.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência	21

2.8 Técnicas de extração.....	23
2.8.1 Extração líquido-líquido.....	28
Capítulo 3	30
3. Experimental	31
3.1 Reagentes e soluções	31
3.2 Amostras	31
3.3 Procedimento para validação dos modelos de calibração	32
3.4 Recuperação da extração e coeficiente de partição.....	33
3.5 Extração líquido-líquido em cachaças	34
3.6 Estabilidade do furfural.....	35
3.7 Procedimentos para validação do método proposto.....	35
3.7.1 Repetitividade.....	35
3.7.2 Testes de Recuperação	36
3.8 Metodologia baseada na GC-FID	36
3.9 Tratamento do resíduo.....	37
Capítulo 4	38
4. Resultados e Discussão.....	38
4.1 Avaliação de interferentes no método proposto	39
4.2 Parâmetros de desempenho para determinação de furfural.....	40
4.3 Estabilidade da solução padrão de furfural	44
4.4 Determinação de furfural.....	45
4.5 Repetitividade.....	48
4.6 Testes de recuperação	48
4.7 Tratamento do resíduo.....	49
Capítulo 5	50
5. Considerações finais	51

5.1 Conclusão	52
5.2 Perspectivas	53
Referências	54

Lista de figuras

Figura 2.1 – Fluxograma da produção da cachaça.....	9
Figura 2.2 - Estrutura química do furfural.....	12
Figura 2.3 – Estrutura química do HMF.....	13
Figura 2.4 – Formação do HMF e furfural a partir da celulose.....	15
Figura 2.5 – Formação do furfural a partir da xilose.....	15
Figura 2.6 – Formação do HMF a partir de uma sacarose.....	16
Figura 2.7 – Formação do HMF, a partir da glicose, via reação de Maillard.....	17
Figura 2.8 - Decomposição térmica do HMF.....	17
Figura 2.9 - Esquema reacional proposto para o método de Hewitt´s.....	18
Figura 3.1 - Diagrama esquemático do método de LLE proposto.....	34
Figura 4.1 - Espectros das amostras brutas de cachaça e do padrão em clorofórmio.....	39
Figura 4.2 - Curva analítica do método proposto para a determinação de furfural.....	40
Figura 4.3 - Gráfico dos resíduos do modelo de calibração do método proposto.....	41
Figura 4.4 - Estudo da estabilidade do furfural na solução padrão após resfriamento.....	45
Figura 4.5 – Espectros do resíduo antes e após o tratamento.....	49

Lista de tabelas

Tabela 2.1 - Limites de contaminantes orgânicos e inorgânicos na cachaça.....	6
Tabela 2.2 - Limites de compostos secundários na cachaça.....	6
Tabela 2.3 - Composição da cana-de-açúcar e sólidos solúveis no caldo.....	11
Tabela 2.4 - Propriedades dos principais solventes utilizados para extração de furfural.....	29
Tabela 3.1 - Características das amostras de cachaça adquiridas.	31
Tabela 3.2 - ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.	32
Tabela 4.1 - Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes do modelo obtido para a determinação de furfural em amostras de cachaça.....	41
Tabela 4.2 - Tabela ANOVA para o modelo linear da curva analítica para determinação de furfural.....	43
Tabela 4.3 - Valores de LOD e LOQ, em mg 100 mL ⁻¹ , estimados ao nível de 95% de confiança, para o método de referência e a extração líquido-líquido.....	43
Tabela 4.4 - Efeito da proporção (solução padrão: solvente extrator) na recuperação do analito.....	46
Tabela 4.5 - Valores médios e incertezas das concentrações das soluções padrões (n=3) usando a metodologia proposta.....	46
Tabela 4.6 - Valores médios e incertezas das concentrações das amostras de cachaça (n=3) para a determinação de furfural (mg 100 mL ⁻¹) usando a metodologia proposta e o método de referência.....	47
Tabela 4.7 - Teste de recuperação de furfural em amostras de cachaças (n=3).....	48

Lista de siglas e abreviaturas

ANOVA – Análise de variância (do inglês, analysis of variance)

AOAC – Associação Oficial de Química Analítica (do inglês, Association of Official Analytical Chemists)

CAR – Carboxan

CPE – Extração no ponto de nuvem (do inglês, cloud point extraction).

CTAB – Brometo de cetil trimetilamônio

DCM – Diclorometano

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, dispersive liquid-liquid microextraction)

DNPH - Dinitrofenilidrazonas

DVB - Divinilbenzeno

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FID - Detector de ionização de chama (do inglês, flame ionization detector)

GC - Cromatografia gasosa

HMF - hidroximetilfurfural

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, high performance liquid chromatography)

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ITEP - Instituto de Tecnologia de Pernambuco

LLE - Extração líquido-líquido (do inglês, liquid-liquid extraction)

LLME - Microextração líquido-líquido (do inglês, liquid-liquid microextraction)

LOD - Limite de detecção (do inglês, limit of detection)

LOQ - Limite de quantificação (do inglês, limit of quantitation)

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

m-MME - Extração micelar mista (do inglês, mixed micellar extraction)

MMQ - Método dos mínimos quadrados

MQ - Média quadrática

MS – Espectrômetro de massa.

PA – Poliacrilato

PCV - Pirocatecol violeta

PDMS - Polidimetilsiloxano

PLE - Extração líquida pressurizada (do inglês, pressurized liquid extraction)

PSA – Amina primária secundária (do inglês, primary secondary amine)

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SPE - Extração em fase sólida (do inglês, solid phase extraction)

SPME - Microextração em fase sólida (do inglês, solid phase microextraction)

THF - Tetraidrofurano

UV – Radiação Ultravioleta

Resumo

Título: **Um Método Espectrofotométrico para Quantificação de Furfural em Cachaças por Extração Líquido-Líquido.**

Um método simples e rápido para determinação de furfural em cachaças por extração líquido-líquido (LLE) é proposto. As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que analitos sejam determinados por meio da separação de componentes da amostra devido, principalmente, às diferenças de solubilidade que possibilitam a separação de um ou mais componentes da matriz por meio do contato e agitação mecânica de um solvente imiscível ou pouco miscível na matriz. O componente a ser separado (analito) deve solúvel neste solvente. No método proposto, são misturadas quantidades iguais de amostra/padrão e de clorofórmio, esta mistura é agitada mecanicamente por cerca de 2 minutos, formando uma emulsão. Após isto, espera-se mais um minuto para haver a completa separação de fases. Uma vez que o analito encontra-se no solvente extrator (clorofórmio), este foi separado da mistura e submetido à análise espectrofotométrica na região do UV (em 279 nm). A estabilidade da solução padrão de furfural e o descarte dos resíduos foram avaliados. A viabilidade do método LLE foi avaliada na determinação de furfural em amostras de cachaça. O método proposto foi comparado com o método baseado na cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), nenhuma diferença estatística entre os resultados foi observada. O método LLE mostrou-se sensível, exato e preciso com recuperações na faixa de 102 a 109%, faixa linear de 0,2 a 8 mg 100 mL⁻¹, limites de detecção e quantificação de 0,0118 mg 100mL⁻¹ e 0,0203 mg 100mL⁻¹, respectivamente, fator de repetitividade de 0,026. A metodologia de LLE foi validada e aplicada com sucesso na análise de oito amostras de cachaças demonstrando assim, a viabilidade e confiabilidade do método. Os teores de furfural, nas cachaças analisadas, variaram de 0,4 a 1,1 mg 100 mL⁻¹, estando pois, as bebidas analisadas, dentro do limite, de 5 mg 100 mL⁻¹, estabelecido pela legislação.

Palavras-chave: extração líquido-líquido; furfural; cachaças.

Abstract

Title: **A Spectrophotometric Method for Quantification of Furfural in Cachaças by Liquid-Liquid Extraction.**

A simple and rapid method for determination of furfural in yeast-distilled beverages from sugar cane by liquid-liquid extraction (LLE) is proposed. The techniques of extraction and / or preconcentration allows analytes can be determined by separation of sample components due, mainly, the solubility differences that allows the separation of one or more matrix components by contact and mechanical stirring of a solvent immiscible or slightly miscible in the matrix. The component to be separated (analyte) must be soluble in this solvent. In the proposed method equal amounts of standard sample and chloroform are mixed, the mixture is stirred mechanically for about 2 minutes, forming an emulsion. After this, it's expected one minute to complete phase separation. Once the analyte is in the extractor solvent (chloroform) it was separated from the mixture and subjected to spectrophotometric analysis in the UV region (279 nm). The stability of the standard solution of furfural and waste disposal were evaluated. The viability of the LLE method was evaluated in the determination of furfural in samples of sugar cane spirits. The proposed method was compared with the reference method based on gas chromatography with flame ionization detector (FID) (GC-FID), no statistical difference between the results was observed. The LLE method was sensitive, accurate and precise with recoveries in the range 102-109%, linear range of 0,2 to 8 mg 100 ml⁻¹, limits of detection and quantification of 0,0118 mg 100 mL⁻¹ and 0,0203 mg 100 ml⁻¹, respectively, repeatability factor of 0,026. The LLE methodology was validated and successfully applied to the analysis of eight cachaças samples demonstrating the feasibility and reliability of the method. The levels of furfural, in the analyzed cachaças was between 0,4 to 1,1 mg 100 mL⁻¹ and is therefore, beverages analyzed, within the limit of 5 mg 100 mL⁻¹, established by legislation.

Keywords: liquid-liquid extraction, furfural, yeast-distilled beverages.

Capítulo

1

Um Método Espectrofotométrico para
Quantificação de Furfural em Cachaças por
Extração Líquido-Líquido

INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do Problema

O monitoramento contínuo dos parâmetros da qualidade da cachaça é de suma importância tanto para o mercado produtor, como para o mercado consumidor assegurando inúmeros benefícios, dentre eles, o incentivo à melhoria contínua da qualidade da cachaça e do processo de produção, agregação de valor às marcas, aumentando a competitividade dos produtores; facilitando a entrada do produto em novos mercados internos e externos, gerando mais informação e proteção ao consumidor, facilitando decisões de compra (BRASIL, 2005). Neste sentido, as análises físico-químicas são um importante instrumento de controle da qualidade das bebidas e de caracterização destas, indicando se as mesmas se enquadram dentro dos padrões de qualidade para que sejam liberadas para consumo. Os métodos clássicos de análise geralmente utilizam técnicas lentas e laboriosas. Esses inconvenientes podem ser superados pelo desenvolvimento de novos métodos de análise que permitam determinações rápidas e de baixo custo.

As cachaças são as bebidas destiladas mais consumidas no Brasil e ocupam a terceira posição no cenário mundial (SAKAI, 2012). A padronização do produto evita prejuízos para a qualidade sensorial de bebidas destiladas e são temas amplamente estudados por diversos grupos de pesquisa (MAIA, 1994; MASSON et al., 2007; NAGATO et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2003; SORATTO, VARVAKIS, HORII, 2007). Segundo a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE). Estima-se que a produção nacional de cachaça encontra-se em torno de 1,5 bilhão de litros por ano, movimentando nesses últimos anos cerca de US\$ 6,0 bilhões anuais (PEREIRA, 2003). Surge então, a necessidade de normas, regulamentos e padrões de qualidade para o consumo. A identidade e as características de qualidade a que deve obedecer à cachaça, encontram-se definidas na Instrução Normativa N° 13, de 29 de junho de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2005). Substâncias como: alcoóis, acroleína, carbamato de etila, ácido acético, acetato de etila, acetaldeído, furfural e hidroximetilfurfural são encontradas em quantidades muito baixas, dificultando seu isolamento, caracterização e quantificação e, sem o conhecimento delas, torna-se muito difícil modificar as características e/ou controlar a qualidade do produto (SORATTO, VARVAKIS, HORII, 2007). Dentre os componentes congêneres encontra-se o furfural e o hidroximetilfurfural, aldeídos aromáticos de potencial cancerígeno cuja determinação é realizada por técnicas laboriosas e caras.

Diante do exposto, foi proposto, no presente trabalho, o desenvolvimento de um método para determinação de furfural e hidroximetilfurfural, expresso como furfural, baseado na extração líquido- líquido (LLE) e detecção espectrofotométrica a 279 nm. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pela cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID).

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Desenvolver uma metodologia simples, rápida e de baixo custo para quantificação de furfural e hidroximetilfurfural, expressos como furfural, em cachaças por extração líquido-líquido.

1.2.2 Específicos

- Estabelecer as condições para realizar a LLE;
- Desenvolver uma metodologia de LLE viável para determinação de furfural em cachaças;
- Aplicar a metodologia proposta para quantificação de furfural em amostras reais de cachaças e soluções padrão;
- Comparar as características analíticas da metodologia proposta com as características da metodologia GC-FID.

Capítulo

2

Um Método Espectrofotométrico para
Quantificação de Furfural em Cachaças por
Extração Líquido-Líquido

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cachaças

A aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38% a 54% em volume a 20° C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo da cana. A cachaça, por sua vez, é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % a 48% em volume, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionado açúcares até 6g L⁻¹, expressos em sacarose (BRASIL, 2005). Introduzida pelos escravos dos engenhos de açúcar, em meados do século XVI, a história da cachaça se confunde com a história do Brasil. Os engenhos de cachaça foram se espalhando, tornando a cachaça a bebida alcoólica mais consumida no Brasil Colônia contra a vontade da Corte Portuguesa, que proibiu sua produção e comercialização tornando-se um símbolo de resistência contra sua dominação. O produto nacional começou a ganhar força entre todas as classes sociais no século XIX e início do XX. Durante a Semana de Arte de 1922, a cachaça foi considerada um símbolo da cultura nacional e, desde então, é considerada a mais brasileira das bebidas e famosa em todo o mundo, sendo a destilada mais consumida no Brasil e a terceira no cenário mundial (SAKAI, 2012). Em 2001 foi classificada como um produto tipicamente brasileiro pelo Decreto nº 4062 de 21 de dezembro de 2001 (BRASIL, 2001).

Os padrões de qualidade para o consumo e as características, que essas bebidas devem obedecer, encontram-se definidas na Instrução Normativa Nº 13, de 29 de junho de 2005 do MAPA (BRASIL, 2005). As substâncias que oferecem risco a saúde humana têm seus limites máximos estabelecidos e estão descritos na **tabela 2.1**. (BRASIL, 2005).

Os coeficientes congêneres ou compostos secundários, como também podem ser chamados, são substâncias, componentes ou impurezas voláteis, exceto álcool, e têm seus limites máximos estabelecidos conforme mostrado na **tabela 2.2**. A soma desses coeficientes congêneres não deverá ser inferior a 200 mg 100 mL⁻¹ e superior a 650 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro (BRASIL, 2005). Esses componentes secundários são responsáveis pelo aroma e sabor, porém, quando se encontram acima dos limites estabelecidos, pelo MAPA, podem comprometer a qualidade da cachaça e ser prejudicial à saúde (PEREIRA et al., 2003).

Tabela 2.1 – Limites de contaminantes orgânicos e inorgânicos na cachaça.

Contaminante	Limite Máximo
Orgânicos	
Álcool metílico	20 mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro
Acroleína (2-p ropenal)	5 mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro
Carbamato de etila	150µg/l de cachaça
Álcool sec-butílico (2-butanol)	10 mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro
Álcool n-butílico (1-butanol)	3 mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro.
Inorgânicos	
Cobre (Cu)	5 mg/l de cachaça
Chumbo (Pb)	200µg/l de cachaça
Arsênio (As)	100µg/l de cachaça

Tabela 2.2 – Limites de compostos secundários na cachaça.

Compostos Secundários	Máximo
Acidez volátil expressa em ácido acético	150 mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro
Ésteres totais expressos em acetato de etila	200 mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro
Aldeídos totais em acetaldeído	30 mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro
Furfural, expresso pela soma de Furfural e Hidroximetilfurfural	5 mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro
Soma dos álcoois isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2-metil -1-butanol +3metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol)	360 mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro

Os aldeídos, de um modo geral, têm um limiar de detecção muito baixo e tendem a ser considerados como defeitos do aroma (ARAÚJO, 2010). Possuem odor pungente e em geral desagradável. Sua presença é rapidamente detectada na degustação devido ao desconforto

provocado nas fossas nasais e lacrimejamento, sendo também, responsáveis por outros efeitos fisiológicos indesejáveis, como dor de cabeça e indisposição. Podem resultar da oxidação de alcoóis (VILELA, 2005), da decomposição química de carboidratos, da pirogenação da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques, da ação de ácidos sobre as pentoses e hexoses (YOKOYA, 1995; GOMES, 1997).

A acidez, expressa em ácido acético, é consequência da má condição do mosto fermentado devido à contaminação por bactérias acéticas que metabolizam o etanol produzindo o ácido (ARAÚJO, 2010). Uma acidez elevada na cachaça é sensorialmente desagradável, mas a presença de ácidos, em pequena quantidade, é de grande importância para a qualidade da bebida, uma vez que, durante sua produção os ácidos reagem com os alcoóis presentes, aumentando a formação de ésteres que são responsáveis pelo aroma (VILELA, 2005).

Os ésteres são, quantitativamente, os mais numerosos na cachaça e em outras bebidas destiladas. São provenientes de diversas etapas: fermentação, destilação e envelhecimento (VILELA, 2005). Tanto a quantidade quanto a proporção dos diferentes ésteres, influencia significativamente a percepção de aromas nas bebidas, pois, são responsáveis pelo aroma de fruta, sendo seu aroma mais acentuado quando o álcool que os compõem possui baixo peso molecular, além disso, cada éster tem um aroma peculiar (SOUZA, 2006). No entanto, o teor elevado desses ésteres participa de forma negativa na qualidade da bebida por aumentar seu sabor pungente (ARAÚJO, 2010). O éster em maior quantidade na cachaça é o acetato de etila, com aroma frutado, representando aproximadamente 80% de todos os ésteres da cachaça (SOUZA, 2006). Fatores como o tipo e quantidade de fermento, temperatura, aeração e agitação na fermentação e qualidade do caldo influenciam fortemente na formação dos ésteres (VILELA, 2005).

Os alcoóis superiores ou óleo fúsel, como também podem ser chamados, esterificam-se durante o envelhecimento e são importantes por sua atividade solvente em frações orgânicas. O álcool isoamílico é o álcool superior predominante nas bebidas alcoólicas. Seu conteúdo é aproximadamente metade do total da fração de alcoóis superiores (VILELA, 2005). As condições que favorecem o aparecimento desses alcoóis são: temperatura, elevada taxa de crescimento das leveduras, altos níveis de inóculo, aeração do meio e substituição de açúcares como maltose por glicose. Com o aumento do número de carbonos, o aroma modifica-se

substancialmente e os alcoóis tornam-se oleosos, alguns deles lembram aroma de flores (ARAÚJO, 2010).

A presença desses componentes na cachaça e aguardente de cana pode ser afetada pelas características da própria matéria prima, pelos processos enzimáticos de certos microorganismos no processo fermentativo, pelo processo de destilação e pelas condições de estocagem (SAKAI, 2012). Após a colheita, a cana é levada à moenda para a extração do caldo, para isso ela deve estar limpa, sem palhas, terra ou outras impurezas, que além de aumentar o volume a ser prensado na moagem são fontes de contaminação do caldo e posteriormente do fermento, reduzindo a capacidade de fermentação. O caldo deve ser filtrado em peneira de malha, para que se retenha o bagacilho e outras impurezas, visto que, o bagacilho favorece a contaminação durante a fermentação e contribui para a formação, durante a destilação, de furfural, que é um produto indesejável. Na decantação, outros contaminantes (terra, areia, detritos) que não ficaram retidos na filtração, deverão ficar, agora, detidos. Ao caldo é acrescentado água para correção do grau Brix entre 14^o a 16^o (VILELA, 2005). O processado de fermentação é concluído em aproximadamente 24 horas e o fermento depositado no fundo da dorna (inóculo) costuma ser reutilizado na próxima fermentação (EMBRAPA, 2014b). Como produto da fermentação, tem-se o vinho de cana que é constituído principalmente de água, etanol e de compostos secundários como ácidos, álcoois, ésteres, compostos carbonílicos, acetais, fenóis, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados e sulfurados e outros. Esses compostos estão presentes em concentrações mínimas, porém qualificam e caracterizam a bebida. A destilação do vinho pode ocorrer por dois métodos distintos: por batelada em alambiques, na grande maioria, de cobre e pelo método contínuo, que ocorre em coluna de destilação. O vinho destilado por batelada resulta num produto dividido em três frações: destilado de cabeça, coração ou corpo e calda. O destilado de coração corresponde à cachaça propriamente dita, apresentando teor alcoólico entre 38-48% e equivale a cerca de 80% do material destilado. O destilado de cabeça, obtido na fase inicial contém substâncias mais voláteis como metanol, aldeídos e ésteres e o destilado da calda ou água fraca contém os ácidos e o furfural, por conta disso aproveita-se o corpo enquanto a cabeça e a calda devem ser descartadas. Na destilação realizada em coluna de aço inoxidável não ocorre à separação do destilado em frações pelo fato de que este sistema é contínuo, ou seja, a alimentação da coluna com vinho e a saída do destilado acontecem simultaneamente e durante todo o processo. Após a etapa de destilação, a cachaça já pode ser engarrafada para comercialização ou ser estocada em tonéis de madeira para envelhecimento

(VILELA, 2005; EMBRAPA, 2014b). A **figura 2.1** apresenta o fluxograma da produção da cachaça.

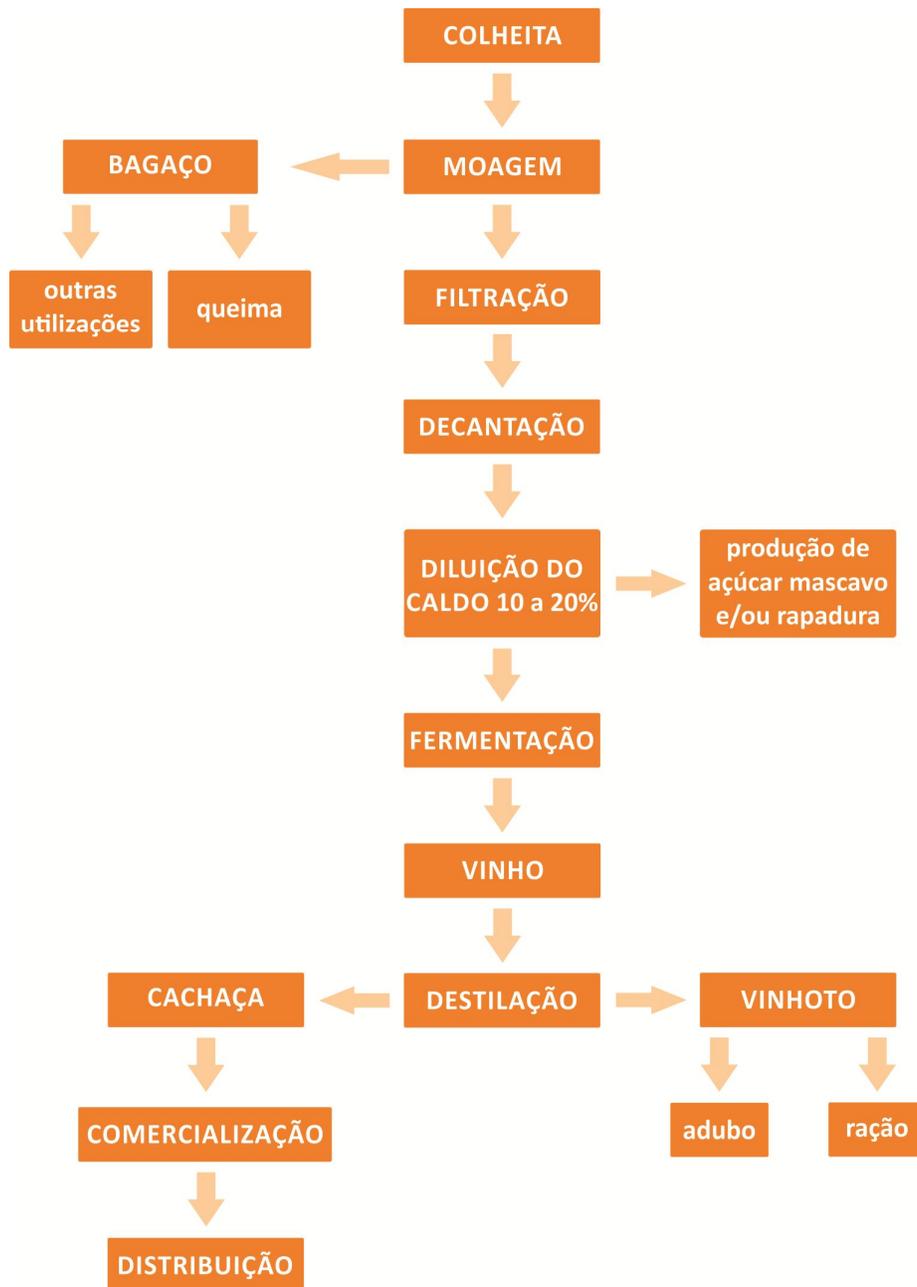


Figura 2.1 – Fluxograma da produção da cachaça a partir da cana-de-açúcar. (adaptada de EMBRAPA, 2014b).

Nas cachaças, o teor de furfural é resultante da queima da matéria-prima antes da colheita (NOVAES, 1974; YOKOYA, 1995); da desidratação e ciclização de pentoses provenientes, principalmente do bagacilho (YOKOYA, 1995), durante o processo de

destilação do vinho devido ao aquecimento dos alambiques ou colunas de aço inox, do processo de envelhecimento devido à extração e modificação dos componentes da madeira (MUTTON, MARTÍNEZ e MUTTON; SINGLETON, 1995). Para formação do hidroximetilfurfural (HMF), os mesmos fatores agem sobre as frutoses e glicoses (GOMES, 1997). Além disso, esses aldeídos podem ser formados também, pela ocorrência da reação de Maillard, durante a destilação do vinho, que é a principal fonte de compostos heterocíclicos como furanos, pirazinas e piridinas (LÉAUTE, 1990).

Desse modo, a definição da composição química dos componentes secundários e contaminantes permite a padronização do produto de modo a adequá-lo aos padrões de qualidade, além de proteger a saúde do consumidor, incentivar à melhoria contínua da qualidade da bebida, do processo de produção e armazenamento, agregando valor às marcas, aumentando assim, a competitividade entre os produtores (SAKAI, 2012).

2.2 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar apresenta grande importância no agronegócio brasileiro. Do caldo adquire-se o açúcar, a cachaça, o álcool, a rapadura; do bagaço, obtêm-se o papel, a ração, o adubo e o combustível; das folhas, a cobertura morta ou ração animal. Assim, a agroindústria da cana-de-açúcar, agrega os sistemas de produção alimentar, não alimentar e energético (HAMERSKI, 2009). É uma planta constituída de um sistema radicular, dos colmos, das folhas e dos nódulos inter colmos sendo o colmo, a parte morfológica de maior interesse comercial, devido à maior quantidade de sacarose encontrada nessa fração (MANTELATTO, 2005). A constituição química dos colmos é eminentemente variável devido a fatores como a variedade da cultura, a idade fisiológica, condições climáticas durante o desenvolvimento e maturação, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e do tipo de cultivo (HAMERSKI, 2009).

A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de cachaça é elemento crucial na qualidade do produto e produtividade do mesmo. Dentre os principais fatores relacionados às características da cana estão: o local e ambiente de cultivo, pragas e doenças, variedade e planejamento agrícola, esse relacionado com a maturação da cana, com a queima, colheita, carregamento e transporte. Deve ser colhida sem queima, visto que, a queima dos canaviais é prejudicial às características da bebida, pois acelera a deterioração da cana, ainda no campo, pela inversão da sacarose, causa o acúmulo de cinzas nas dornas de fermentação, interferindo

negativamente no processo fermentativo e aumento do teor de furfural e compostos correlatos, depreciando a qualidade do produto (VILELA, 2005).

O caldo de cana é uma solução aquosa contendo uma multiplicidade de compostos, sendo que destes, 90%, aproximadamente, são açúcares. A composição da cana varia dentro de certos limites, segundo apresentado na **tabela 2.3** (HAMERSKI, 2009).

Tabela 2.3 – Composição da cana-de-açúcar e sólidos solúveis no caldo.

Componentes da cana-de-açúcar	(%) em massa na cana-de-açúcar
Água	73-76
Sólidos	24-27
Sólidos solúveis	10-16
Fibra (seca)	11-16
Constituintes do caldo de cana	(%) em sólidos solúveis
Açúcares	75-92
Sacarose	70-88
Glicose	2-4
Frutose	2-4
Sais	3,0-4,5
Ácidos orgânicos	1,5-5,5
Ácidos carboxílicos	1,1-3,0
Aminoácidos	0,5-2,5
Outros não-açúcares orgânicos	
Proteínas	0,5-0,6
Amido	0,001-0,100
Gomas	0,3-0,6
Ceras, gorduras, fosfolipídeos	0,05-0,15

Inúmeros parâmetros influenciam na formação do perfil do caldo de cana. Entre eles: a variedade da cana, tipo de solo, adubação, condições climáticas, grau de maturidade da cana, tipo de colheita, tempo entre a queima, corte e o processamento e conteúdo de pontas e palha (SOUZA, 1988).

A sacarose é susceptível a reações em meio ácido e básico, por efeito da temperatura, enzimas e micro-organismos (MANTELATTO, 2005). Em meio ácido, a sacarose resulta em açúcares redutores (glicose e frutose). Em meio alcalino e sob aquecimento, a sacarose pode levar a formação de furfural (EDYE; CLARKE, 1995). O aquecimento da sacarose, a temperaturas elevadas ($>140^{\circ}\text{C}$), associada ao pH baixo do mosto acarreta na desidratação dos açúcares e hidrólise dos bagacilhos (celulose, m-celulose, hemicelulose e outros) desencadeia um grupo complexo de reações químicas originando produtos fortemente coloridos denominados caramelos, dentre eles o furfural e o HMF. Os açúcares redutores e reações de Maillard são também, responsáveis pela formação de caramelos. As reações de Maillard são reações que ocorrem na presença de amins ou aminoácidos e açúcares redutores, resultando numa mistura de compostos escuros. (HAMERSKI, 2009).

2.3 Furan-2-carbaldeído

O furfural também denominado, 2-furaldeído, 2-furancarboxaldeído, 2-furanocarboxialdeído, furaldeído, 2-furanaldeído, fural e furfuraldeído é um aldeído furânico, de fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$, massa molecular de $96,08 \text{ g mol}^{-1}$ e cuja estrutura química é apresenta na **figura 2.2**.

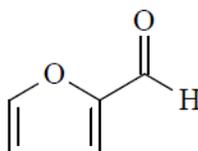


Figura 2.2 – Estrutura química do furfural.

Esse aldeído furânico apresenta-se, à temperatura ambiente, sob a forma de um líquido oleoso incolor, com um odor peculiar, passando para amarelo ou castanho, mediante exposição ao ar e à luz, devendo ser conservado em recipiente escuro. É solúvel em etanol, éter, acetona e clorofórmio apresentando 83 g L^{-1} de solubilidade em água (FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA, 2012) sendo o principal produto da hidrólise de pentoses (ANTAL, LEESOMBOON e MOK, 1991). Esse composto é considerado um indicador da degradação de alimentos e bebidas quando encontrado em concentrações acima do limite permitido estando, assim, relacionado às mudanças no aroma do alimento (AZEVEDO et al., 2007).

A produção mundial de furfural é de 250.000 t/ano, sendo diretamente utilizada como solvente ou como material de partida para a preparação de outros solventes orgânicos, como o álcool furfúrico e o tetraidrofurano (THF) (AUSTRALIAN, 2006; MONTANÉ, et al, 2002; WIN, 2005;). Como matéria prima, apresenta a vantagem de ser produzido a partir de fontes renováveis. As principais fontes utilizadas para obtenção de furfural são o sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e farelo de trigo, (AUSTRALIAN, 2006; MONTANÉ, et al, 2002) destacando-se o bagaço de cana-de-açúcar e sabugos de milho, que contêm 25 e 35% de pentoses sendo responsável por mais de 98% de todo o furfural produzido (WIN, 2005).

O contato prolongado ou repetitivo com o furfural pode afetar o sistema nervoso central, além de produzir dermatites, irritação da mucosa e trato respiratório. Pode, ainda, causar dor de cabeça, convulsões, paralisia, danos no fígado e rins, possibilidade de efeitos cancerígenos, vertigens, garganta seca/dolorida e hemorragia nasal. Se ingerido, causa náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, perturbações de coordenação, câimbras/contrações musculares incontroláveis (FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA, 2012).

2.4 5-Hidroximetil-2-furaldeído

O 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) é um aldeído furânico que também pode estar presente nas bebidas alcoólicas sendo designado, também, por hidroximetilfurfuraldeído, hidroximetilfurfural ou 5-(hidroxi)-2-furanocarboxaldeído. Sua massa molecular de 126,1 gmol^{-1} corresponde à fórmula $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ e a estrutura química é representada na **figura 2.3**.

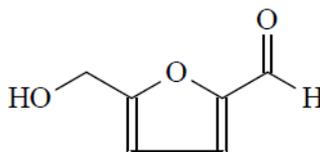


Figura 2.3 – Estrutura química do HMF.

À temperatura ambiente, esse composto apresenta-se sob a forma de um líquido viscoso de cor amarela e odor característico. O HMF é solúvel em água, metanol, etanol, acetona, acetato de etila, dimetilformamida, éter, benzeno, clorofórmio e menos solúvel em

tetracloroeto de carbono, sendo a sua solubilidade em éter de petróleo muito baixa. Tem sido reconhecido como o produto principal da decomposição da frutose, da glicose e de outros açúcares em meio ácido (ANTAL, LEESOMBOON e MOK,1991). Assim como o furfural, o HMF é fotossensível, devendo ser conservado ao abrigo da luz, podendo também ser utilizado na avaliação da qualidade dos produtos alimentares para averiguar o seu envelhecimento (LEE e NAGY, 1988) e o grau de aquecimento a que foram submetidos (MORALES, ROMENO e JIMINEZ, 1994). O aumento da concentração do HMF está relacionado, principalmente, com mudanças na cor, em espécies que sofrem reação de Maillard ou caramelização. Nas cachaças, é resultante da ação dos mesmos fatores que provocam a formação do furfural, porém, para formação do HMF, esses fatores agem sobre as frutoses e glicoses (GOMES, 1997).

A exposição ao HMF pode prejudicar rins e fígado, provocar irritação ocular, inflamação da pele além de acentuar dermatites pré-existentes. Sua ingestão produz náuseas e vômitos. Se inalado, pode causar irritação das vias respiratórias, alterações na função pulmonar (pneumoconiose) e tem ainda, potencial cancerígeno (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, 2012).

2.5 Formação do Furfural e HMF na produção de bebidas

O furfural e o HMF formam-se a partir das pentoses e hexoses. Esses açúcares encontram-se no bagaço e no caldo extraído da cana-de-açúcar. A composição média, do bagaço, é de 50% de umidade, 2% de Brix (sólidos solúveis em água) 46% de fibra (32 – 50% de celulose, 19 – 25% de hemicelulose e 23-32% de lignina) e 2% de cinzas (PANDEY et al., 2000). A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas, enquanto que, a hemicelulose é um heteropolissarídeo formado por pentoses, hexoses e ácidos urônicos (SILVA, 2010). As maiores frações de hemicelulose são de xilose, ácido acético e furfural. Já para a celulose, a glicose e o hidroximetilfurfural constituem a maior fração. (GOUVEIA et al., 2009). A temperatura elevada associada ao baixo pH do mosto acarreta desidratação dos açúcares e hidrólise de polissacarídeos dos bagacilhos (celulose, hemicelulose) formando furfural e HMF (MAIA, 1994).

A formação do furfural e HMF a partir da hidrólise ácida de celuloses e hemiceluloses é mostrado na **figura 2.4 e 2.5**. A formação do HMF a partir da frutose é mostrado na **figura 2.6**.

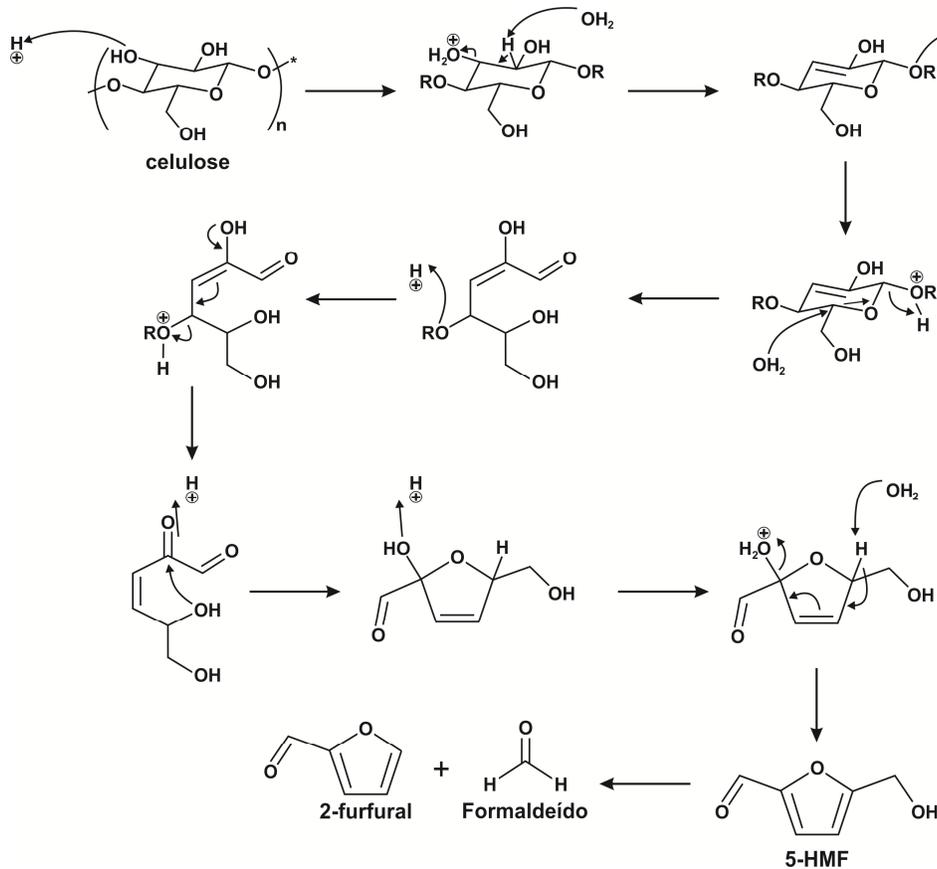


Figura 2.4 – Formação do HMF e furfural a partir da celulose (SCHEIRS et al., 1998).

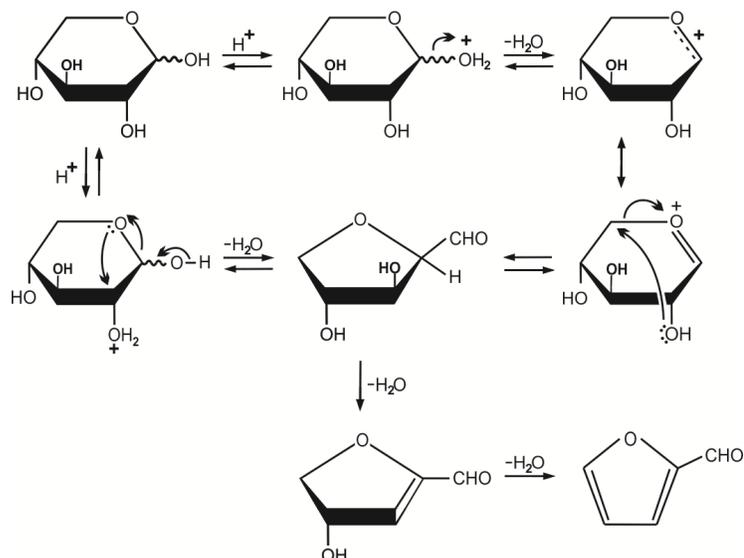


Figura 2.5 – Formação do furfural a partir da xilose (ANTAL, LEESOMBOON e MOK,1991).

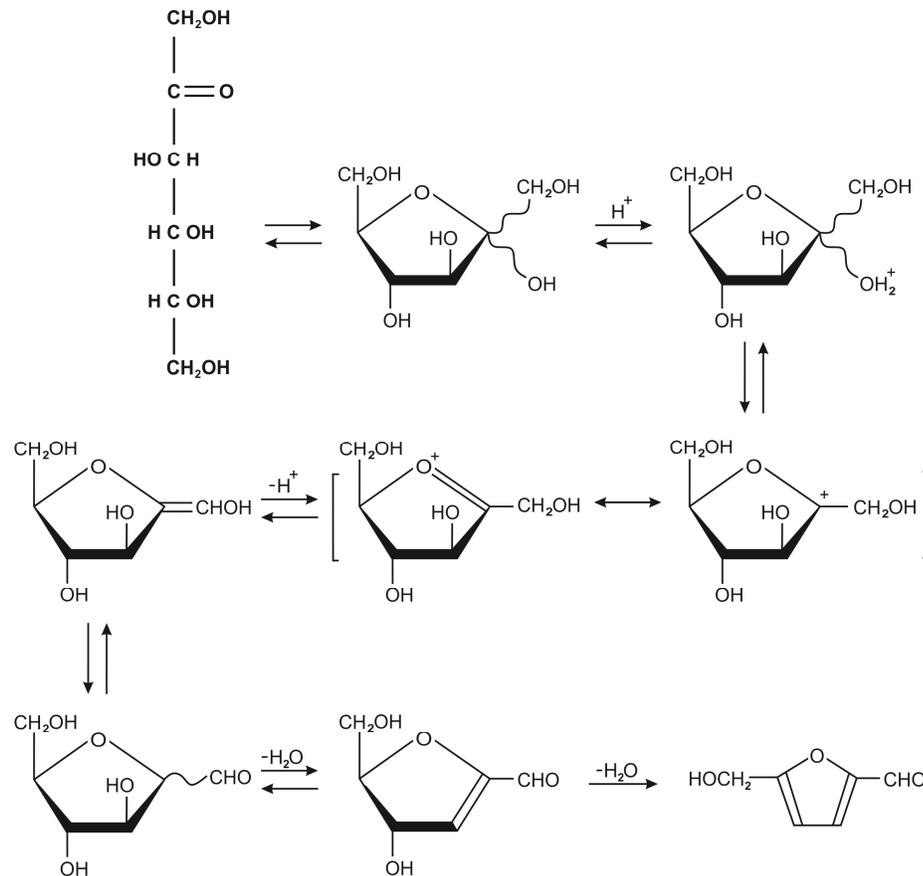


Figura 2.6 – Formação do HMF a partir de uma sacarose (ANTAL e MOK, 1990).

A formação de aldeídos furânicos também pode ser proveniente da reação de Maillard (Wong, 1989). Esta ocorre entre o grupo carbonílico de uma hexose e uma função amina. A formação do HMF, mediante a reação da glicose com uma função amina, é mostrada na **figura 2.7**.

O furfural também pode se formar da decomposição térmica do HMF, tal como ilustrado na **figura 2.8**. Este processo poderá originar 2,5-furano-di-aldeído, 5-metilfurfural e furfural (KROH, 1994)

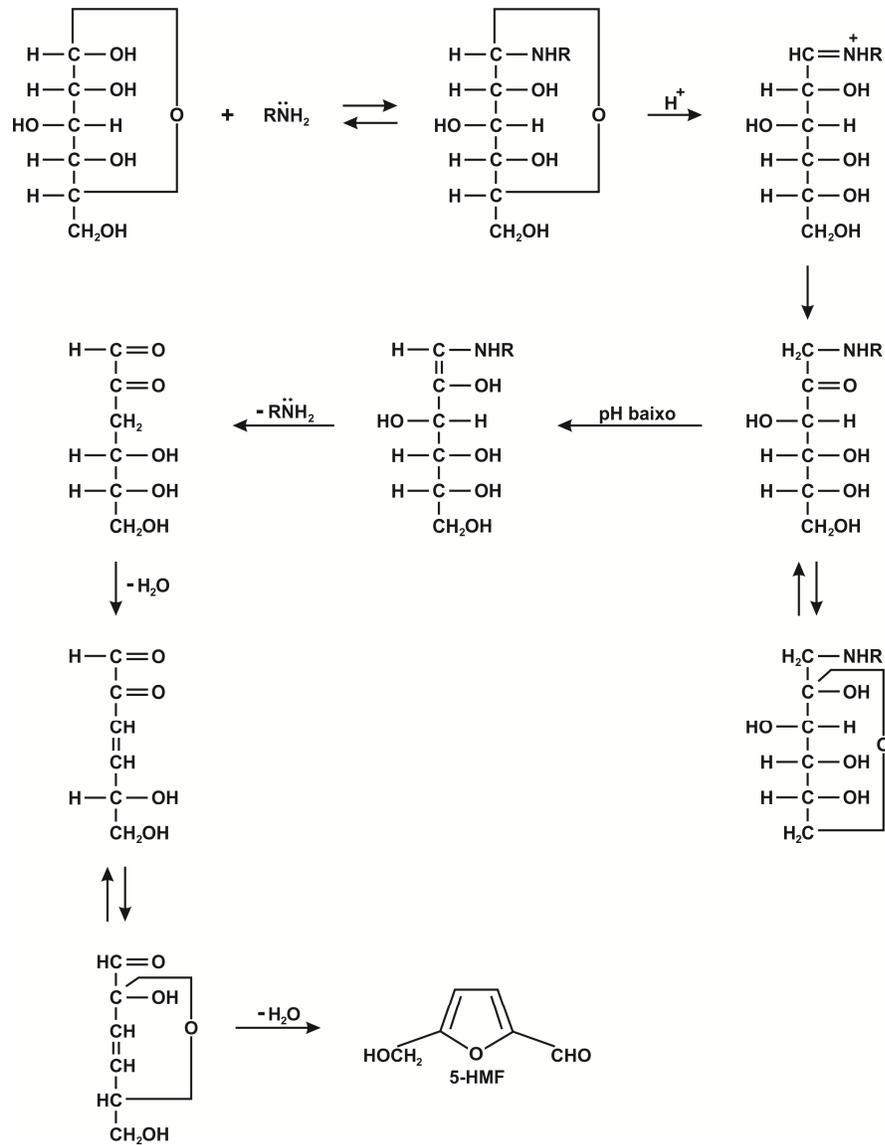


Figura 2.7 – Formação do HMF, a partir da glicose, via reação de Maillard (Wong, 1989).

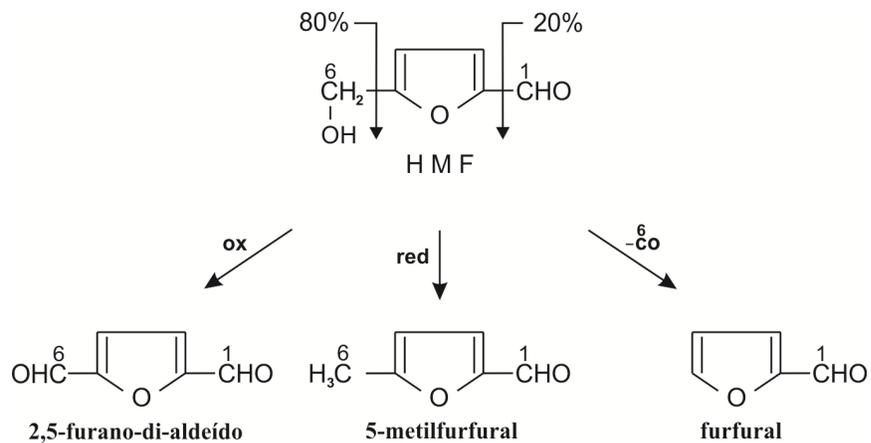


Figura 2.8 – Decomposição térmica do HMF (adaptada de KROH, 1994).

2.6 Métodos de referência para determinação de furfural em bebidas

As cachaças são misturas complexas compostas principalmente de etanol e água e um grande número de compostos minoritários que podem estar presentes nas matérias-primas ou formados durante diferentes etapas do processo de fabricação, tais como: alcoóis, ácidos, ésteres, aldeídos, polifenóis, metais, aminoácidos, etc (MADRERA e VALLES, 2007). Os métodos de referência para determinação de furfural, expresso como a soma de furfural e HMF, adotados pelo MAPA, para essas bebidas, baseiam-se no método de Hewitt's (BRASIL, 2012b) e na técnica de cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID) (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2007).

O método de Hewitt's, consiste no desenvolvimento de coloração rosa, pela reação do furfural e anilina em meio ácido, a qual é apresentada na **figura 2.9**.

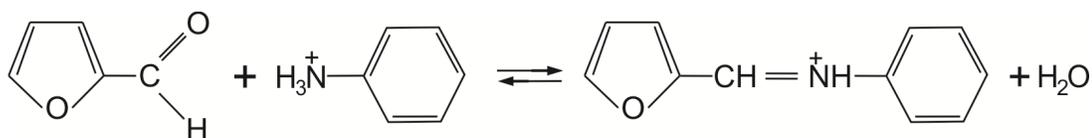


Figura 2.9 – Esquema reacional proposto para o método de Hewitt's (adaptada de ZAREI, 2009)

O procedimento incide na preparação de soluções padrões de furfural a 50% v/v de etanol para construção da curva linear colocando nas abscissas mg de furfural por 100 mL de álcool anidro e nas ordenadas as leituras obtidas em absorvância a 520 nm. A determinação de furfural é feita com o destilado da amostra corrigido a 50% de etanol em volume por meio da determinação do grau alcoólico real. Essa determinação, também chamada de álcool em volume a 20° C, é aplicável para a determinação da porcentagem de álcool em volume a 20° C em bebidas alcoólicas. A graduação alcoólica (% em volume) é obtida através do uso de uma tabela de conversão da densidade relativa a 20° C / 20° C determinada no destilado alcoólico da amostra. A densidade relativa do destilado pode ser determinada com o uso de picnômetro ou densímetro digital automático ou outro aparelho como hidrômetro ou densímetro calibrado. Após corrigir a graduação do destilado da amostra de modo a obter uma graduação alcoólica de 50% (v/v), alíquotas de 10 mL da amostra são submetidas às mesmas condições utilizadas na preparação da curva analítica e adicionadas a elas, quatro gotas de anilina e 1,0 mL de ácido acético glacial. O branco utilizado consiste na solução de álcool

etanólico 50% v/v e a leitura das absorvâncias das amostras, também realizadas a 520 nm (BRASIL, 2012).

O método descrito apresenta várias etapas a serem realizadas e controladas como destilação das amostras, correção do grau alcoólico para 50% (v/v) de álcool etílico e controle da temperatura, estando, pois, mais susceptível a erros durante os procedimentos metodológicos.

A cromatografia gasosa, com detecção por ionização em chama, é o método oficial para análise de furfural em bebidas destiladas (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2007). A separação dos componentes da mistura ocorre pela passagem de um gás inerte (fase móvel) por uma coluna cromatográfica (fase estacionária). A quantificação é realizada por comparação com padrões analíticos. O detector de ionização de chama (FID) possui uma chama onde as substâncias orgânicas provenientes da amostra são queimadas ou ionizadas (DEL GRANDE, 2013). A quantificação é realizada pela padronização interna, utilizando 1-pentanol e a partir das curvas de calibração, a concentração é obtida.

2.7 Metodologias para determinação de furfural e HMF em bebidas.

Vários outros métodos espectrofotométricos e cromatográficos têm sido propostos na literatura para a determinação de furfural e HMF em bebidas.

2.7.1 Métodos espectrofotométricos

Os métodos espectrofotométricos oferecem características muito atraentes que incluem a instrumentação simples, o rápido tempo de resposta e a fácil operação (ZAREI, 2009). DOBRINAS, STANCIU e SOCEANU, (2009) determinaram furfural, expresso como a soma de furfural e HMF, em três bebidas destiladas pelo método de Hewitt's.

O método de Winkler foi utilizado para análise de bebidas destiladas (WINKLER, 1995; MANSILLA, SALINAS e NEVADO, 1992). O método consiste na preparação de um reagente de derivação que reagirá com a amostra a 18° C por 5 minutos requerendo, deste modo, um rigoroso controle de temperatura e tempo. O reagente de derivação consiste em quantidades conhecidas de p-toluidina, ácido barbitúrico, ácido acético glacial, etanol e água deionizada. O produto de cor violeta apresenta absorção máxima em 585 nm, tem elevada taxa de formação, porém, é instável mostrando que para tempos maiores que 100 s, a

absorbância diminui rapidamente. Esse método exige um controle rigoroso da temperatura reacional, da concentração de p-toluidina e do ácido barbitúrico, da acidez do meio, da proporção de etanol, visto que, o produto é instável em solução aquosa.

Outro procedimento baseia-se na reação de furfural com acetato de mercúrio (II) com ácido sulfúrico por 30 minutos, sob aquecimento em banho de água em ebulição sendo esse, o tempo ótimo para a reação fotométrica. As concentrações e volumes de acetato de mercúrio (II) e ácido sulfúrico afetam substancialmente a banda de absorção devendo ser também, controlados rigorosamente. O produto reacional origina uma banda muito intensa de absorção em 238 nm podendo ser quantificado através da curva analítica construída nas condições ideais estabelecidas (KHABAROV et al., 2006).

É descrito também, a determinação de furfural em nível de ultra-traços em água por extração no ponto de nuvem da fenilhidrazona, produto da reação do furfural com a fenilidrazina em meio ácido. Neste método, a fenilidrazona é concentrada num pequeno volume de fase rica em surfactante. A separação e pré-concentração do furfural ocorrem a partir da mistura de micelas num sistema misto de surfactantes iônico e não iônico (Triton X-100 / dodecilsulfato de sódio- SDS). A reação entre a amostra contendo o analito, a fenilidrazina em meio ácido e o SDS ocorre imersa num banho de água a 70° C durante 10 min, seguido de arrefecimento para posterior adição do Triton X-100. A separação da fase aquosa e da fase rica em surfactante dar-se-á por centrifugação durante 5 min a 3500 rpm. A mistura é então, arrefecida num banho de gelo-sal para aumentar a viscosidade da fase surfactante que será dissolvida e diluída em etanol para medição espectrofotométrica a 446 nm (ZAREI, 2009).

2.7.2 Cromatografia Gasosa

Alguns trabalhos descritos na literatura utilizam a cromatografia gasosa (GC) com detecção por ionização em chama (FID) para análise de furfural, expresso como a soma de furfural e HMF. Esse método permite ainda, a quantificação de outros componentes secundários em bebidas (DRAGONE, 2009; GASPAR e LOPES, 2009; MADRERA e VALLES, 2007).

O procedimento consiste na determinação de componente voláteis majoritários (concentração maior ou igual que 10 mg L^{-1}) e minoritários dependendo dos seus níveis de concentração em amostras. No entanto, o estudo de compostos minoritários tem certos inconvenientes resultantes das suas baixas concentrações e o grande número de compostos presentes. Por esta razão, a quantificação dos compostos minoritários, pode requer uma extração líquido-líquido clássica. O método pode necessitar também de uma diluição prévia, o que poderia causar a insolubilidade de alguns dos componentes que são solúveis em altas proporções de álcool ou modificar o equilíbrio entre o etanol e compostos reativos alterando, assim, a composição original do destilado (MADRERA e VALLES, 2007).

ALVES, 2011, reporta a análise de furfural por GC-FID, no destilado alcoólico da cajarana, por meio da utilização da coluna do tipo carbowax 20m. O princípio é baseado na adição de uma mesma quantidade do padrão interno (pentanol) a bebida destilada e a uma solução padrão de furfural. Tanto a amostra quanto a solução de concentração conhecida são injetadas diretamente no cromatógrafo e os picos correspondentes são comparados. O teor encontrado para soma de furfural e HMF foi de $1,5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$.

Para determinar, se o teor de furfural encontra-se dentro do estabelecido pelo MAPA para cachaças, VILELA, 2005 destilou 100 mL de cada amostra de cachaça e, do destilado, recolheu 20 mL num balão volumétrico de 100 mL, o qual foi completado com água destilada e em seguida homogeneizado. Deste balão foram retiradas alíquotas, para as determinações por GC-FID tendo como fase estacionária, a coluna DB-WAX.

MADRERA e VALLES, 2007 determinaram furfural em bebidas destiladas utilizando uma coluna meta.wax, encontrando teores entre 1 e $80,8 \text{ mg L}^{-1}$, através de injeção direta das amostras e preparo das soluções a 40% de etanol em água.

MASSON, 2007 analisou amostras de cachaça fabricadas a partir da matéria- prima colhida sem a queima e após a queima da mesma. Utilizou-se de uma coluna DB-WAX e de furfural como reagente para comparação das áreas de picos das amostras. Os resultados mostraram que a queima do palhço da cana influenciou, significativamente, na concentração do furfural. Das amostras analisadas, apenas uma encontrava-se com o teor acima do limite máximo fixado pelo MAPA.

2.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação de furfural em bebidas é reportado na literatura como um método viável de determinação. Neste, variáveis podem estar presentes e serem controladas para aumentar a resolução das medidas e também a sensibilidade. Dentre as variáveis encontram-se o tipo e tamanho de coluna cromatográfica e partículas da mesma, constituição e proporção da fase móvel, temperatura, loop de injeção, tipo de detectores.

YUAN e CHEN, 1999 reportam o uso da coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H de troca de cátions de hidrogênio baseada em resina divinilbenzenosulfonado-copolímero de estireno com uma partícula de 9 mm, temperatura da coluna mantida a 25 ° C e fase móvel constituída por acetonitrila e solução aquosa de ácido sulfúrico, loop de 20 mL e detectores de fotiodo e índice de refração. As análises permitiram a quantificação de furfural e HMF em sucos de frutas baseado no tempo de retenção dos analitos.

Métodos de derivatização para a obtenção de compostos do tipo 2,4-dinitrofenilidrazonas (2,4-DNPH) também têm sido recorrentes (BLAU e HALKET, 1993; DUCAN e PIGGOTT, 1989; NASCIMENTO, 1998). Neste caso, a quantificação de aldeídos e acetonas emprega o método de padronização externa e detecção a 365nm. Os derivados carbonílicos da 2,4-DNPH são obtidos conforme descrito na literatura: a 2,4-DNPH é dissolvida em ácido sulfúrico concentrado e água destilada. A esta solução, os aldeídos padrões, dissolvidos em etanol são adicionados. Os correspondentes derivados são então, isolados via filtração e purificados por recristalização com etanol absoluto (BLAU e HALKET, 1993). A pureza das hidrazonas pode ser confirmada por determinação do ponto de fusão e análise elementar (C, H, N). As soluções padrões dos derivados carbonílicos das 2,4-DNPHs podem enfim, ser obtidas para construção das curvas de calibração. Para análise das amostras, uma solução 0,4% de 2,4-DNPH em acetonitrila é posta para reagir com a amostra e com o ácido perclórico. A solução resultante é agitada e mantida a temperatura ambiente por 40 minutos, após o que alíquotas desta solução são injetadas no cromatógrafo líquido usando metanol-água como fase móvel e empregando uma coluna C-18 (NASCIMENTO, 1998).

AQUINO et al., 2004, quantificou furfural e HMF em xarope de guaraná e cajuína. Para as análises cromatográficas foram utilizadas as colunas CLC-SIL e C18. As determinações de HMF e furfural foram realizadas empregando-se o método do padrão externo. Foram usadas alíquotas de 25µL, de cada amostra filtrada. A fase móvel, acetonitrila: água 20:80 v/v e detecção a 285nm. Observou-se que, a concentração média do HMF, nas amostras de cajuínas de cor escura é muito maior que nas cajuínas claras, fato atribuído, segundo os autores, ao

elevado e/ou prolongado tempo de aquecimento destas bebidas, indicando a degradação térmica das hexoses, visto que, esse é um dos processos que mais contribui para formação do HMF.

HO, HOGG e SILVA, 1999 quantificaram furfural e HMF em vinhos de 10 e 30 anos por HPLC, com injeção direta sem pré-tratamento das amostras, utilizando uma coluna C18, fase móvel, constituído por metanol contendo 2% de ácido fórmico em água e detecção em 280nm. Os picos foram identificados por comparação, com os correspondentes, das soluções padrão. As análises mostraram que, os vinhos mais envelhecidos, apresentavam maior teor desses analitos (SOUZA et al., 2009).

2.8 Técnicas de extração

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise de substâncias de interesse seja possível por meio da separação de componentes de misturas complexas. Neste caso, grande parte das matrizes cujos componentes se deseja determinar, apresentam-se como uma mistura multicomponente havendo assim, a necessidade de técnicas de preparo, purificação, isolamento e/ou pré-concentração de amostras como um procedimento inicial de separação do analito de sua matriz. É crucial, nesta técnica, a análise da natureza química e física dos componentes de uma mistura, no que diz respeito à solubilidade e a características ácida, básica ou neutra. Após a etapa de extração, a fase orgânica pode ser removida para determinação e quantificação do analito (VOGEL, 1989).

Técnicas de extração acopladas a HPLC e a GC têm sido largamente utilizadas para análise de bebidas. Dentre as principais técnicas, encontram-se a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), a microextração em fase sólida (SPME), a extração em fase sólida (SPE), a extração no ponto de nuvem (CPE) e a extração líquido-líquido (LLE).

Na SPE, os analitos são retidos após passarem por um cartucho contendo sorvente e, posteriormente, um solvente orgânico é utilizado para eluí-los. Em geral, os procedimentos para extração em fase sólida são: condicionamento do adsorvente, carga da amostra, lavagem, eluição (CALDAS, 2011).

LI et al.,2009 determinou furfural em cerveja utilizando, como preparo das amostras, uma fase sólida de copolímero de estireno-divinilbenzeno e C18 condicionada com 5,0 mL de

acetonitrila e 5,0 ml de água deionizada. Amostras de cerveja foram desgaseificada em banho de ultra-som e passadas pela coluna SPE. O furfural retido na coluna foi lavado com 5 mL de água pura e eluída três vezes com 1,0 mL de acetonitrila. A solução eluída foi, então, usada para análise por HPLC. Essa, por sua vez, foi constituída de uma fase estacionaria C18, detecção em 280 nm e proporções diferentes de fase móvel, tendo como fase A: 0,01 % (v/v) de ácido trifluoroacético em água; fase B: acetonitrila.

Amostras de vinho foram diluídas com água deionizada (1:1) e fungicidas foram recuperados a partir do sorvente Oasis HLB, o qual foi lavado com água. Na eluição, acetona e CH_2Cl_2 foram utilizados na mesma proporção. Os dados obtidos, para amostras com e sem tratamento, foram comparados, demonstrando a eficácia da técnica para análise de fungicidas em vinhos (MONTES, 2009).

Na SPME, uma fibra de sílica fundida é coberta com a fase estacionária, geralmente polidimetilsiloxano (PDMS), que é exposta na amostra aquosa ou gasosa por um tempo necessário e depois, o analito é desorvido pela fase móvel ou por aquecimento, diretamente no injetor do cromatógrafo a gás (CALDAS, 2011).

Aguardentes de cana foram diluídas (1:1) em água e um aparato para o “headspace” foi preparado. A armadilha foi constituída de aço inoxidável revestido com Tenax-TA. Os compostos voláteis presentes no “headspace” da amostra foram arrastados para o Tenax-TA, por meio de um fluxo de nitrogênio, livre de oxigênio, num tempo de extração de 60 min, para posterior análise por GC-MS (NÓBREGA, 2003).

Cachaças foram submetidas à SPME e GC-MS para quantificação de alcoóis, ésteres e aldeídos. Para o procedimento de microextração foi utilizado fibras de poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano – divinilbenzeno (PDMS-DVB) e carboxan-polidimetilsiloxano (Car-PDMS). O septo dos frascos, contendo as amostras, foi perfurado e a fibra foi exposta nos seus “headspace”. Após a extração a fibra foi recolhida e levada ao cromatógrafo. As diferentes fibras foram estudadas para as diferentes classes de compostos orgânicos levando-se em conta, o somatório das áreas dos picos dos compostos, sendo que, para ésteres, a fibra que se mostrou mais adequada foi PDMS; para aldeídos, a de PDMS-DVB e para álcoois, a de PA (MORES, 2009).

Amostras de conhaque foram diluídas com água, saturadas com NaCl, a fim de aumentar a adsorção de compostos voláteis e mantidas a 50° C para extração por “headspace”

por 30 min, tendo como fase estacionária, fibra de PDMS. A quantificação de alcoóis, ésteres e ácidos ocorreu por GC-FID (EBELER, 2000).

A DLLME baseia-se no sistema ternário de solventes. O princípio da técnica é a dispersão de um solvente extrator (imiscível com água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa, o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator (CALDAS, 2011). A microextração líquido-líquido dispersiva, combinada com a cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por ultravioleta é descrita, na literatura para análise de bebidas.

Em amostras de água mineral e suco de frutas disponíveis comercialmente, CABUK e KÖKTÜRK, (2013) adicionaram NaCl, metanol (como dispersor) e 1-octanol (como solvente de extração) para determinação de antioxidantes. O solvente de extração foi disperso na amostra como gotículas muito finas, formando uma solução turva. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm. O solvente orgânico foi removido da solução utilizando uma pipeta Pasteur e injectado na HPLC o qual tinha uma coluna de Phenomenex Max - RP protegida por uma coluna C18, diferentes proporções, ao longo do tempo, de fase móvel composta por acetonitrila e água deionizada (ácido trifluoroacético a 0,1 %).

Fungicidas presentes em vinhos também tiveram suas quantidades determinadas. Para tal, as amostras foram preparadas através da passagem, após diluição das amostras com água deionizada (1:1), em um cartucho de SPE (sorvente Oasis HLB). Ao eluído foi adicionado o solvente extrator (sulfureto de carbono) e água deionizada. A mistura ternária foi agitada e centrifugada a 3600 rpm para permitir a separação de fases e ser injectada no cromatógrafo gasoso equipado com um detector de captura de micro- elétron (MONTES, 2009).

Amostras de bebidas, incluindo cerveja, refrigerante e suco, foram diluídas 1:1 com água. Uma solução de amostra foi colocada numa centrífuga e misturada com acetonitrila (dispersor), o líquido iônico [C8MIM] [PF6] (solvente extrator) e DNPH (reagente de derivatização). A solução turva resultante foi colocada no forno de micro-ondas. Neste passo, o formaldeído foi derivatizado com DNPH. Em seguida, a solução foi centrifugada a 4000 rpm e a fase aquosa superior foi removida, enquanto que, a fase líquida iônica foi dissolvida em acetonitrila. A solução resultante foi submetida à análise por HPLC, para determinação de formaldeído, tendo como fase móvel, uma mistura de acetonitrila: água (60:40), coluna XDB - C18 e detecção em 352 nm (XU et al., 2011).

Benzotriazóis foram determinados em águas residuais (tratadas e não tratados) e águas fluviais, por GC-MS, sendo as amostras, submetidas à DLLME anteriormente. O método consiste na mistura das amostras com Na_2HPO_4 , extração com anidrido acético, acetonitrila e tolueno. A centrifugação ocorreu a 3000 rpm. Após a separação de fases, a fase extratora foi injetada no sistema de GC-MS e o método, validado em termos de linearidade, eficiência extrativa, precisão, LOD e LOQ (NESCATELLI, 2014)

A extração no ponto nuvem é uma técnica que utiliza agentes tensoativos não- iônicos, para a formação de micelas. Quando aquecidas, a uma temperatura específica (temperatura do ponto de turvação), as soluções tornam-se turvas. Acima da temperatura de ponto de turvação, a solução micelar separa-se numa fase rica em surfactante, de pequeno volume onde o analito irá concentrar-se, e numa fase aquosa diluída, em que a concentração do surfactante é próxima da concentração micelar crítica (ZAREI, 2009).

Um estudo em soluções padrão de furfural foi realizado por ZAREI, 2009. A separação e pré-concentração do furfural ocorrem a partir da mistura de micelas num sistema misto de surfactantes iônico e não iônico (Triton X-100 / dodecilsulfato de sódio- SDS). A reação entre a amostra contendo o analito (solução aquosa de furfural), a fenilhidrazina em meio ácido e o SDS ocorre imersa num banho de água a 70 °C durante 10 min, seguido de arrefecimento para posterior adição do Triton X-100. A separação da fase aquosa e da fase rica em surfactante dar-se-á por centrifugação durante 3500 rpm. A mistura é então, arrefecida num banho de gelo-sal para aumentar a viscosidade da fase surfactante que será dissolvida e diluída em etanol para medição espectrofotométrica a 446 nm.

A determinação de estanho em refrigerantes e amostras de água foi realizada, tendo como surfactante, brometo de cetil trimetilamônio (CTAB). Soluções padrão de Sn foram transferidas para centrífuga, juntamente com solução de violeta de pirocatecol (PCV), de CTAB e de iodeto de potássio. A turvação da solução ocorreu sem aquecimento e a separação da fase aquosa e rica em surfactante, foi realizada por centrifugação a 3800 rpm. A fase rica em surfactante foi dissolvida e diluída com dimetilformamida. A absorbância da solução foi medida a 576 nm. Às amostras de refrigerantes, foi adicionado, ácido nítrico concentrado. A amostra foi, em seguida, aquecida cuidadosamente, evaporando até próximo da secura. O pH, da amostra digerida, foi ajustado para 4 por adição de solução de hidróxido de sódio. A solução foi, então, diluída com água e os mesmos procedimentos, adotados para as soluções

padrão, foram agora, adotados para as amostras de refrigerante (MADRAKIAN e GHAZIZADEH, 2009).

A extração líquido-líquido (LLE) baseia-se na separação de um ou mais componentes da matriz de origem, frequentemente um meio aquoso, por meio da agitação de um solvente orgânico imiscível ou pouco miscível em água, mas cujo componente a ser separado é solúvel. (VOGEL, 1989).

Carbamatos em suco de uva e achocolatados foram quantificados, após o preparo das amostras por LLE. Para tal, 4,0 mL de acetonitrila foi adicionado a 2,0 mL das amostras de bebidas. Nas amostras de suco de uva, 1,5 % de NaCl foi também adicionado antes do contato com o solvente extrator. O sistema foi posto sob agitação por 60 s. Após a separação de fases, a fase orgânica foi analisada por HPLC, com coluna C18, fase móvel água: acetonitrila 65:35 (v:v) e detecção em 195 nm e 213 nm. (GOULART et al., 2012).

Bebidas destiladas foram submetidas à LLE para posterior, quantificação de dietilftalato. Proporções iguais de amostra e de 1,1,2 - triclorotrifluoroetano foram agitadas e centrifugadas a 3000 rpm. A fase extratora foi removida e analisada por GC-MS (LEITZ et al., 2009).

Compostos voláteis, presentes no corante caramelo, foram isolados de amostras de refrigerantes por extração líquido- líquido. Em um funil de separação, foram colocados o corante e o solvente extrator (acetonitrila), na proporção 1:1 (v/v). Após agitação por 5 minutos, o funil foi deixado em repouso. A fase mais densa foi cuidadosamente retirada. Na sequência, sulfato de sódio foi adicionado ao extrato. A análise cromatográfica dos voláteis foi realizada no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG-MS) tendo como fase estacionária, coluna DB-5 de poli-dimetil-siloxana com 5% de fenila. Dentre os compostos mais presentes nos caramelos analisados, encontram-se os furfural, visto que, esses estão presentes em alimentos processados termicamente devido a pirogenação dos açúcares. A degradação térmica e rearranjo de carboidratos (reações de Maillard) ocorre durante o processamento e cozimento, ocasionando o escurecimento dos alimentos (ALMEIDA, 2011).

O método QuEChERS, (do inglês, Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe) trata-se um procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos pesticidas e outros. Foi idealizado para gerar extratos que pudessem ser analisados por GC e/ou LC acopladas a espectrometria de massa em série. É baseado nas seguintes etapas: extração com acetonitrila,

seguida da partição promovida por sais como sulfato de magnésio e cloreto de sódio e posterior extração em fase sólida, tendo como sorvente PSA (amina primária secundária). Após o desenvolvimento da primeira versão do método, outras variantes do método surgiram como o método QuEChERS acetato e o método QuEChERS citrato.

Melaço e caldo de cana-de-açúcar foram submetidos a extração pelo método QuEChERS para posterior quantificação de agrotóxicos nessas matrizes alimentícias. Para tal, foram utilizadas 10,0 g e 10,0 mL de amostra (melaço e caldo- de- cana, respectivamente), sendo que o melaço foi diluído em 10 mL de água. As amostras foram acidificadas a pH 2,0 com ácido fosfórico. Em seguida, foi adicionado 5,0 mL de acetronitrila e 4,0 g de sulfato de magnésio anidro sob agitação por 1 min. Após, centrifugação a 5000 rpm por 2 min. Alíquotas do sobrenadante foram injetadas no sistema cromatográfico com coluna C18 e fase móvel metanol: água pH 3,0 (SAMPAIO, 2011).

Fenóis voláteis foram extraídos a partir das amostras de cerveja, vinho e suco de frutas utilizando uma metodologia baseada no processo QuEChERS. Num tubo de 10 mL, com 2,5 mL de acetoneitrila, foram adicionados 5,0 mL de amostra. A mistura foi agitada num vórtex durante 1 min. Para a separação das fases, foram adicionadas 2 g de cloreto de sódio sob vigorosa agitação num vórtex durante 1 minuto. A centrifugação ocorreu durante 10 min a 6000 rpm. Subsequentemente, 1,0 mL da fase extratora foi transferido para o tubo PSA d-SPE. O tubo foi agitado em vórtice durante 1 min e centrifugou-se a 6000 rpm durante 10 min. O extrato líquido foi recolhido e analisado por HPLC, coluna C18, a fase móvel constituída de acetoneitrila e tampão de acetato (10 mmol L⁻¹, pH 4.7) e detecção UV em diferentes comprimentos de onda que variaram entre 259 a 341 nm (VALENTE et al., 2013).

2.8.1 Extração líquido- líquido

É uma das técnicas mais utilizadas em laboratórios analíticos para fins de separação. Tem como principais objetivos, melhorar a seletividade de uma técnica de detecção, separando o elemento de interesse dos constituintes majoritários de uma matriz ou somente separar os interferentes mais significativos e elevar a sensibilidade, concentrando o analito ou isolando-o numa fase, onde é observado aumento de sinal analítico (FACCHIN e PASQUINI, 1988). Apresenta ainda, a vantagem de ter configurações simples e a possibilidade de utilizar um número grande de solventes puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma

ampla faixa de solubilidade e seletividade. A seletividade de um método de separação, refere-se à capacidade, do mesmo, de avaliar, as substâncias em exame na presença de outros componentes que possam interferir na sua determinação em uma amostra complexa (ZACARONI, 2009).

A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Os solventes, geralmente, utilizados para a extração são o éter dietílico ou éter diisopropílico, tolueno, diclorometano, éter de petróleo e clorofórmio. A escolha do solvente dependerá da solubilidade da substância a ser extraída e/ou da facilidade com a qual o solvente pode ser separado do soluto (VOGEL, 1989). As propriedades físicas da fase extratora, tais como ponto de ebulição, solubilidade em água, densidade e perda do solvente durante a agitação são de suma importância para escolha do solvente extrator. Na prática, o extrator deve ter um elevado ponto de ebulição, para reduzir a evaporação do solvente durante a extração, além de, ter maior densidade do que a água. (PENA-PEREIRA, LAVILLA e BENDICHO, 2009). Na **tabela 2.4** é mostrado a propriedade dos solventes mais utilizados para extração de furfural.

Tabela 2.4 – Propriedades dos principais solventes utilizados para extração de furfural.

Solventes	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água (mg/L)	Densidade (g/cm ³)
Éter etílico	34,6	7500	0,7135
Acetato de etila	77,1	8700	0,900
Diclorometano	39.6	1980	1.32
Clorofórmio	61.2	8500	1.48

RIBEIRO, et al., (2012), indicaram como solventes para extração de furfural, o clorofórmio, o diclorometano e o acetato de etila, obtendo assim, alta recuperação do analito após identificação em GC-MS. Num sistema composto por água, butanol e diclorometano (DMC), LIU, (2012) obteve índices de recuperação que chegaram a 83% para HMF e 97% para furfural. Outros autores utilizaram, para o mesmo fim e empregando o mesmo método de identificação, o éter etílico (KITTS et al., 2006) e clorofórmio (PORTE, REZENDE E ANTUNES, 2007).

Capítulo

3

Um Método Espectrofotométrico para
Quantificação de Furfural em Cachaças por
Extração Líquido-Líquido

EXPERIMENTAL

3. Experimental

3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes usados foram álcool etílico (Vetec), furfural (Merck) e clorofórmio (Merck), todos de grau analítico.

A escolha da fase extratora foi baseada no ponto de ebulição, solubilidade em água e densidade, de modo que, perdas do solvente durante a agitação fossem minimizadas. Assim, pela menor evaporação do solvente extrator, durante a agitação e por sua maior densidade, em comparação com a água, o clorofórmio foi escolhido como fase extratora.

A solução padrão estoque de 10 mg 100 mL⁻¹ de furfural foi preparada em solução etanólica 50% (v/v) com água deionizada.

As soluções de trabalho de furfural foram preparadas por diluições adequadas da solução padrão estoque com solução de álcool 50% (v/v).

Soluções padrão e amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e acondicionadas a 4°C para minimizar a degradação do furfural.

3.2 Amostras

As características das amostras encontram-se na [tabela 3.1](#).

Tabela 3.1 – Características das amostras de cachaça adquiridas.

Amostra	Nome	Denominação	Teor alcoólico	Origem
1	Cachaça	C1	39%	PB
2	Cachaça	C2	39%	CE
3	Cachaça	C3	42%	PB
4	Cachaça	C4	39%	PE
5	Cachaça	C5	39%	PB
6	Cachaça	C6	40%	PE
7	Cachaça	C7	42%	PB
8	Cachaça	C8	40%	PB

As oito amostras de cachaça, de diferentes marcas, foram adquiridas em supermercados da cidade de João Pessoa – PB e analisadas sem tratamento prévio.

3.3 Procedimentos para validação dos modelos de calibração

A avaliação estatística de desempenho do método proposto em termos da sensibilidade, faixa linear de trabalho e valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foi realizada envolvendo a determinação do teor de furfural em amostras de cachaça.

O modelo de calibração somente pode ser usado para estimar a concentração do analito se for capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. Deste modo, o modelo deve refletir uma regressão estatística significativa não apresentando assim, evidências estatísticas de falta de ajuste. A validação do modelo de calibração pode ser realizada por meio da análise de variância (ANOVA) (PIMENTEL e NETO, 1996). Neste caso, os testes de análise de variância são baseados no método dos mínimos quadrados (MMQ). As curvas analíticas foram construídas e os testes F para falta de ajuste e de significância estatística da regressão foram aplicados aos modelos lineares com base nos resultados da ANOVA. A **tabela 3.2** apresenta as equações para ANOVA de dados experimentais adaptados para modelos obtidos pelo método dos mínimos quadrados (MMQ).

Tabela 3.2 – ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (gl)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$\sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	$p - 1$	$SQ_{reg}/(p-1)$
Resíduo	$\sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n - p$	$SQ_r/(n-p)$
Falta de Ajuste	$\sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$m - p$	$SQ_{faj}/(m-p)$
Erro Puro	$\sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$n - m$	$SQ_{ep}/(n-m)$

Onde: índice i representa o nível da variável x ; j refere-se às medidas repetidas da variável y num dado nível de x ; p indica o número de parâmetros do polinômio do modelo de calibração; n relaciona-se ao número total de medidas; m , o número de níveis da variável independente x .

O LOD e o LOQ podem ser estimados pela relação sinal/ruído e pelos parâmetros da curva analítica. O método da relação sinal/ruído utiliza 20 a 30 medidas do sinal do branco para os cálculos estatísticos. Utilizando-se os parâmetros da curva analítica, o LOD e LOQ apresentam maior confiabilidade estatística e robustez, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão. A sensibilidade foi avaliada segundo as equações abaixo (RIBEIRO et al., 2008).

$$\text{LOD} = 3S_b/b$$

$$\text{LOQ} = 10S_b/b$$

Onde S_b é o desvio padrão da média do sinal do branco e b é a sensibilidade da curva analítica, ou seja, o coeficiente angular em nível de significância de 95%

3.4 Recuperação da extração e coeficiente de partição

A recuperação (ER) pode ser definida como a quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a fase extratora ao final da extração e foi calculada, de acordo com a expressão:

$$\text{ER} = \frac{(C_e \cdot V_e)}{(C_s \cdot V_s)} \times 100$$

Onde: ER é a recuperação do analito após extração; C_e , a concentração de furfural obtida na fase extratora ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) e C_s , a concentração inicial de furfural na solução padrão preliminar ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$); V_e , o volume do solvente extrator (mL); V_s , o volume da solução padrão (mL).

O coeficiente de partição, K_p , foi calculado através da medida das concentrações, na fase extratora e da fase hidroalcoólica, após extração.

$$K_p = C_e / C_a$$

Onde: C_e é a concentração encontrada, na fase extratora, após a extração e C_a , a concentração obtida, na fase hidroalcoólica, após a extração.

3.5 Extração líquido-líquido em cachaças

O método proposto baseia-se na extração quantitativa de furfural da matriz para a fase extratora (clorofórmio), conforme o diagrama esquemático ilustrado na **figura 3.1**. As soluções padrão/amostras (fases hidroalcoólica – A) e o clorofórmio (fase orgânica – O) foram sempre misturadas na proporção de 1:1, com volumes de 5,00 mL sob agitação constante durante 2 minutos à temperatura ambiente. Como resultado da agitação mecânica é formada uma emulsão, a qual, por apresentar uma maior superfície de contato entre amostra e extrator, constitui a etapa onde ocorre o processo de transferência do analito de uma fase a outra.

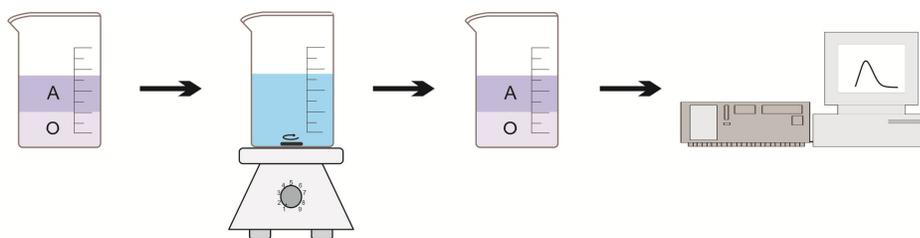


Figura 3.1 - Diagrama esquemático do método de LLE proposto. A e O representam as fases hidroalcoólica e orgânica, respectivamente.

Após agitação, as fases hidroalcoólica e orgânica foram separadas na emulsão formada após o tempo de repouso de 1 minuto. A fase extratora orgânica (corpo de fundo) foi recolhida com auxílio de uma pipeta Pasteur e levada à medição de absorvância em 279 nm em um espectrofotômetro UV-Vis de modelo HP 8453, numa cubeta de 10 mm tendo como branco o clorofórmio puro.

As soluções de trabalho usadas na construção da curva analítica apresentavam concentrações de 0,20; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 8,0 mg 100 mL⁻¹ de furfural e foram submetidas a LLE citada acima.

A análise de cada amostra e solução padrão foi realizada em triplicata e as concentrações foram estimadas a partir da equação obtida da curva analítica estatisticamente validada.

3.6 Estabilidade do furfural

Nesse estudo, uma solução padrão de 100 mg L⁻¹ foi mantida a 4 °C em um freezer e a mesma foi monitorado durante 180 dias através de medidas de absorvância da solução, medidas, no primeiro dia, imediatamente após o preparo da mesma. As medições subsequentes foram feitas nas primeiras quatro semanas após o preparo e, consecutivamente, mês a mês.

3.7 Procedimentos para validação do método proposto

Para validar um método faz-se necessária a aplicação dos parâmetros: especificidade ou seletividade; faixa linear de trabalho; linearidade; sensibilidade; limite de detecção; limite de quantificação; precisão (SILVA e ALVES, 2013). Os testes F e t de Student, a repetitividade e recuperação também foram avaliados e podem ser utilizados na comparação de um método proposto com um método de referência (INMETRO, 2010). Deste modo, o método de LLE apresentado neste trabalho foi validado segundo os parâmetros descritos nesta seção.

3.7.1 Repetitividade

As análises foram realizadas em soluções padrão de 2 a 15 mg/L, sob as mesmas condições descritas no tópico 2.4, ou seja, mesmo método, mesmo material, mesmo operador, mesmo laboratório, curto período de tempo entre as medições. As análises, nos diferentes dias, foram realizadas em triplicatas e a repetitividade foi avaliada através do fator de repetitividade (r), seguindo as instruções da norma ISO 5725-2.

$$r = t_{(n-1,1-\alpha)} \sqrt{n} \cdot S$$

Sendo n , o número de replicatas para cada nível de concentração e S , a média quadrática da variância residual.

3.7.2 Testes de recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados com amostras fortificadas com o analito, em quantidades conhecidas do mesmo, em três diferentes níveis de concentrações. A recuperação foi calculada da seguinte fórmula (INMETRO, 2010):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100$$

Sendo: C1, a concentração do analito na amostra fortificada; C2, a concentração do analito na amostra não fortificada e C3, a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

3.8 Metodologia baseada na GC-FID

As análises de referência foram realizadas pelo ITEP sendo este, um laboratório credenciado pelo INMETRO (BRASIL, 2012a), tendo alusão para tal análise, o Manual de Análise de Bebidas e Vinagres do MAPA (BRASIL, 2012b). As análises realizadas, por esses laboratórios, segundo a Instrução Normativa nº 1, de 16 de janeiro de 2007, fazem parte do método oficial de análise do MAPA.

As amostras de bebidas alcoólicas destiladas são submetidas a uma nova destilação para determinação do grau alcoólico real e correção da proporção do destilado a 50% v/v de álcool etílico. Após essa etapa, as amostras são injetadas diretamente, sem pré-concentração no cromatógrafo gasoso, com injetor “*split/splitless*”, sistema de injeção, coluna Carbowax 20M (60 m x 0,25 mm x 1,0 µm) e detector de ionização de chama (FID). As configurações cromatográficas foram: gás de arraste: Hélio ultra puro; fluxo gás de arraste: 1,5 mL min⁻¹ constante; razão de “*split*”: 1:30; temperatura do forno (rampa): 60 °C, 0 min, 60° - 200°C (10°C min⁻¹), 200°C, 0 min; temperatura do detector: 250 °C; “*ignition threshold*”: 0,5 pA; temperatura injetor: 230 °C; tipo de injeção: “*split*”; fluxo do ar: 350 mL min⁻¹; fluxo de hélio “*make up*”: 35 mL min⁻¹; fluxo de hidrogênio: 30mL min⁻¹; pressão no injetor: 10,2 psi; volume injetado: 1 µL.

3.9 Tratamento do resíduo

O tratamento do resíduo das análises de extração foi realizado segundo metodologia descrita na literatura (EMBRAPA, 2014a). O método baseia-se na filtração do clorofórmio com alumina, à pressão reduzida, e posterior agitação do mesmo com lentilhas de hidróxido de sódio (NaOH) durante aproximadamente 12h. Decorrido esse tempo, procede-se com a filtração e sucessivas lavagens com água grau Milli-Q (razão 1:1 v/v) sucessivamente até que o pH da fase aquosa se encontre entre 5 e 6. O solvente é armazenado em frasco âmbar contendo sulfato de sódio anidro como agente secante, sendo destilado por destilação fracionada em seguida (EMBRAPA, 2014a).

Capítulo

4

Um Método Espectrofotométrico para
Quantificação de Furfural em Cachaças por
Extração Líquido-Líquido

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos referentes ao desempenho analítico e os parâmetros de validação do método proposto.

4.1 Avaliação de interferentes no método proposto

Com o objetivo de avaliar a presença e/ou efeitos de possíveis interferentes, foram analisados alguns espectros das amostras brutas de cachaça e de uma solução padrão de furfural em meio hidroalcoólico, apresentados na **figura 4.1**.

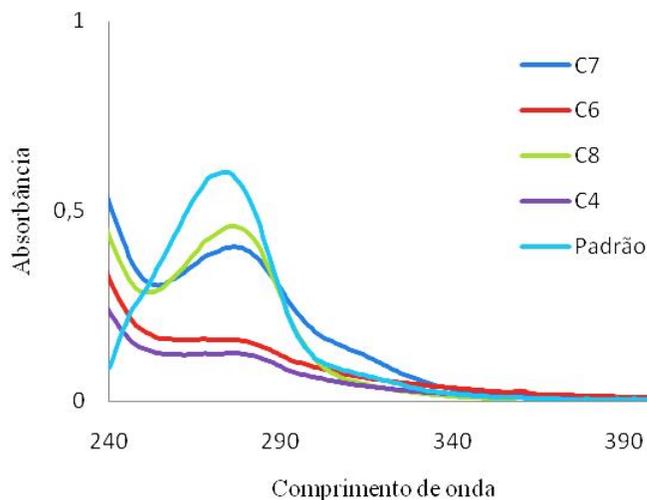


Figura 4.1 – Espectros das amostras brutas de cachaça e do padrão em clorofórmio. C4, C6, C7 e C8 são as amostras de cachaça 4, 6, 7 e 8 respectivamente.

Os espectros das amostras de cachaça C4 e C6 apresentam máximos em 281 nm, sendo que o teor de furfural nestas amostras foram próximos a $1,0 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$, já as amostras C7 e C8, com teores próximos a $0,5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$, apresentaram picos bem maiores no mesmo comprimento de onda. Observa-se que as absorvâncias, medidas nas amostras puras, antes da extração, não estão diretamente relacionadas à concentração de furfural nas amostras, visto que, as amostras brutas que apresentaram menor teor de furfural são aquelas que apresentaram maior absorvância, enquanto que, aquelas amostras com maior concentração de furfural apresentaram espectros cujos picos têm menores valores de absorvância. Este fato pode estar relacionado à presença de interferentes na matriz, os quais podem aumentar e/ou suprimir a absorção de radiação pelo furfural ou pelo HMF na amostra.

É possível verificar no espectro da solução padrão de furfural em clorofórmio, um deslocamento hipsocrômico (279 nm), o que é esperado devido à mudança da matriz, que antes da extração apresentava maior polaridade (solução aquosa de etanol) em relação ao clorofórmio.

Assim, como não há uma relação linear entre a concentração de furfural e HMF com os picos de absorvância medidos nas amostras brutas, faz-se necessário a LLE, como técnica de preparo para análise de tais analitos nas matrizes hidroalcoólicas de cachaça.

4.2 Parâmetros de desempenho para determinação de furfural

Após investigação da faixa linear para a determinação de furfural em cachaças, a curva analítica foi construída para a faixa de concentrações de 0,2 a 8 mg 100 mL⁻¹, em triplicatas, com as soluções padrão de furfural preparadas a 50%(v/v) de álcool etílico de modo a aproximar-se da matriz das amostras de cachaça. A curva analítica é mostrada na **figura 4.2**.

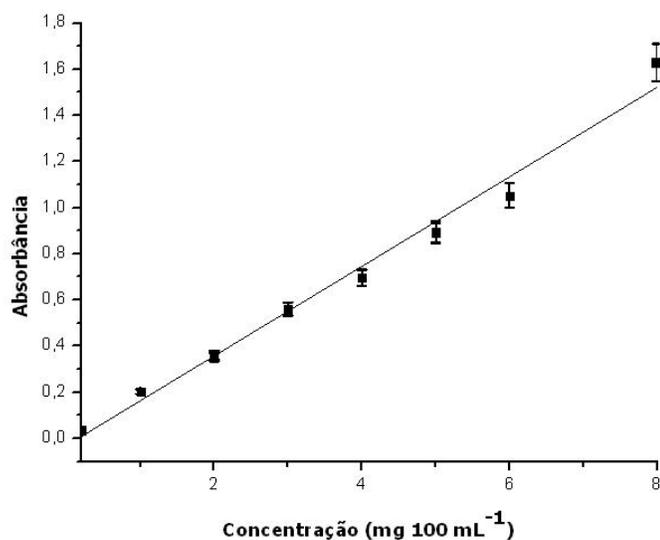


Figura 4.2 – Curva analítica do método proposto para a determinação de furfural.

Conforme a **figura 4.2** é possível verificar que a curva apresenta comportamento linear entre as respostas analíticas e as concentrações de furfural nas soluções padrão. Essa observação é confirmada pela análise do gráfico dos resíduos do modelo e pelos resultados da ANOVA apresentados.

A validação de modelos pela aplicação do método dos mínimos quadrados consiste na análise dos resíduos, da falta de ajuste e da significância estatística da regressão.

A análise de resíduos permite verificar o comportamento dos erros de previsão em relação aos dados experimentais. É possível reconhecer, nos gráficos dos resíduos, o tipo de erro associado aos dados experimentais. Se os resíduos exibirem algum perfil ou estrutura, o modelo apresenta alguma falta de ajuste. Todavia, se os resíduos apresentam-se distribuídos casualmente em torno de zero teremos apenas erros aleatórios.

Observa-se na **figura 4.3** que o gráfico dos resíduos deixados pelo modelo de calibração não apresenta nenhum perfil sistemático, mas sim, distribuição aleatória ao longo da faixa dinâmica estudada indicando que o modelo construído está bem ajustado.

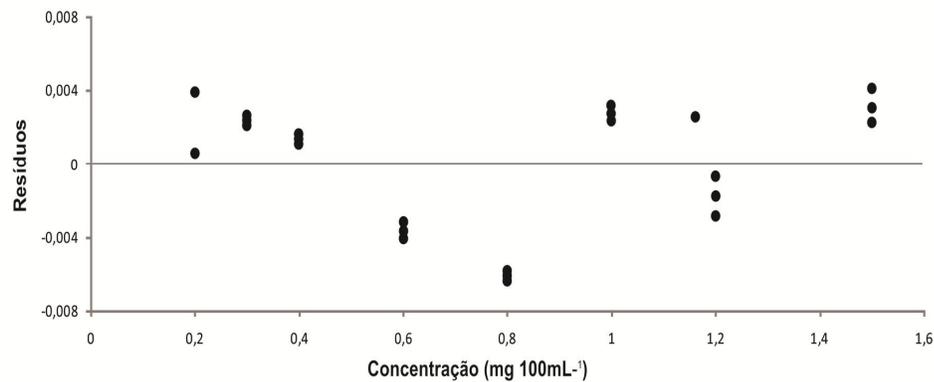


Figura 4.3 – Gráfico dos resíduos do modelo de calibração do método proposto.

A **tabela 4.1** apresenta os parâmetros do modelo de calibração e os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais. Conforme essa tabela, os parâmetros estimados para o modelo de calibração são estatisticamente significativos considerando o nível de confiança de 95%.

Tabela 4.1 – Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes do modelo obtido para a determinação de furfural em amostras de cachaça.

Modelo: $\hat{y} = \alpha + \beta x$	
$\alpha \pm t_{22} \times \text{erro puro}(\alpha)$	$\beta \pm t_{22} \times \text{erro puro}(\beta)$
$- 0,030 \pm 0,0002$	$0,194 \pm 0,0002$

Os resultados da análise de variância, que reforçam a validação do modelo de calibração, são mostrados nas **tabela 4.2**.

O teste de falta de ajuste compara os resíduos deixados pelo modelo para determinações realizadas em vários níveis da variável X (MQ_{faj}) com os resíduos deixados pelas análises repetidas (autênticas) nestes mesmos níveis (MQ_{ep}). Se razão MQ_{faj}/MQ_{ep} é menor que o valor do ponto da distribuição F referente aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} para um determinado nível de confiança, temos um modelo que não apresenta falta de ajuste; O teste de falta de ajuste, para os vários níveis da variável x, compara a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) com a média quadrática devida ao erro puro (MQ_{ep}). A comparação é realizada pela razão $(MQ_{faj})/(MQ_{ep})$. Se esta for menor que o valor do ponto de distribuição F, referentes aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} , temos um modelo sem falta de ajuste. Caso a razão $(MQ_{faj})/(MQ_{ep})$ for maior que o valor do ponto de distribuição F, o modelo apresenta falta de ajuste e necessita ser reestimado e revalidado. As médias quadráticas estarão associadas apenas os erros aleatórios dos dados (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1996).

No teste de significância de regressão compara-se a média quadrática devido à regressão (MQ_{reg}) e a média quadrática residual (MQ_r) com o valor do ponto da distribuição F referente aos graus de liberdade de MQ_{reg} e MQ_r a um certo nível de confiança estatística. Se a razão MQ_{reg}/MQ_r é maior que o valor do ponto da distribuição F para um determinado nível de confiança, a regressão é estatisticamente significativa. Caso contrário, não se pode admitir a existência de uma relação funcional (linear, quadrática, etc) entre as variáveis que possa ser descrita pelo modelo (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1996).

O limite de detecção (LOD) é proporcional à menor concentração da espécie de interesse (analito) que pode ser detectada pela técnica instrumental utilizada. Já o limite de quantificação (LOQ) equivale à mínima concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de reprodutibilidade das medidas pelo método (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1996).

Os valores de LOD e LOQ para a metodologia proposta foram estimados e encontram-se na **tabela 4.3** juntamente com os valores do método de referência. A diferença deve-se aos diferentes sistemas de detecção.

Tabela 4.2 - Tabela ANOVA para o modelo linear da curva analítica para determinação de furfural.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	5,5587	5,5587
Resíduo	0,1626	0,0074
Falta de Ajuste	0,2352	0,0392
Erro Puro	0,4612	0,0288
GI	Signifi. da Regres.	3 e 10 respectivamente
	Falta de Ajuste	1 e 13 respectivamente
Fv1/v2 a 95%	Falta de Ajuste	3,71
	Signif.da Regres.	4,67
MQfaj/MQep		1,36
MQreg/MQr		7,52x10 ²
R²		0,986

O alto valor de MQreg/MQr, evidencia a existência de uma relação linear entre as variáveis y e x, indicando uma relação bastante significativa. A razão entre a média quadrática da falta de ajuste e da média quadrática do erro puro, comparado com F crítico (2,74), no nível de significância de 95%, indica que o modelo encontra-se bem ajustado. Assim, os resultados indicam que o modelo é apropriado para explicar a relação entre a concentração e o sinal medido.

Tabela 4.3 – Valores de LOD e LOQ, em mg 100mL⁻¹, estimados ao nível de 95% de confiança para o método de referência e a extração líquido-líquido.

	Referência (mg 100mL ⁻¹)	LLE (mg 100mL ⁻¹)
LOD	0,132	0,0118
LOQ	0,440	0,0203

LOD - Limite de detecção; LOQ - Limite de quantificação

Em soluções concentradas do analito ou outros solutos, as interações soluto-soluto alteram a estrutura do analito e também modificam a absorvidade. Os desvios são positivos ou negativos conforme as alterações aumentem ou diminuam a absorvidade (SKOOG, 2006).

Em determinações espectrofotométricas, espécies que absorvem fracamente podem ser convertidas em compostos com maior absorvidade molar, visando à determinação de menores quantidades do analito (ROCHA e TEIXEIRA, 2004). O menor LOD observado para LLE pode estar relacionado à maior absorvidade do analito nesse método, visto que, o limite de detecção em solução depende da absorvidade e essa, por sua vez, é característica não só da substância, mas também, do comprimento de onda e do solvente onde a mesma se encontra. Absorvidades altas são desejáveis em análises quantitativas porque levam a uma alta sensibilidade analítica (SKOOG, 2006).

4.3 Estabilidade da solução padrão de furfural

A solução de furfural armazenada em temperatura ambiente apresenta baixa estabilidade devido à degradação do mesmo por reações de oxidação e fotólise. Por esse motivo, é necessária a destilação dessa solução para purificá-la novamente antes de ser utilizada. Para evitar a destilação, foi estudada a viabilidade do resfriamento da solução padrão de furfural como forma de manter sua estabilidade.

Na análise, foram comparadas a resposta instrumental, gerada por uma solução padrão armazenada com a resposta instrumental gerada por uma solução padrão recém preparada. As considerações tomadas no estudo da solução puderam ser estendidas para as demais soluções de diferentes concentrações, visto que, todas foram armazenadas sob as mesmas condições. (BRASIL, 2011).

As variações de absorbância ao longo do tempo podem ser observadas na **figura 4.4**.

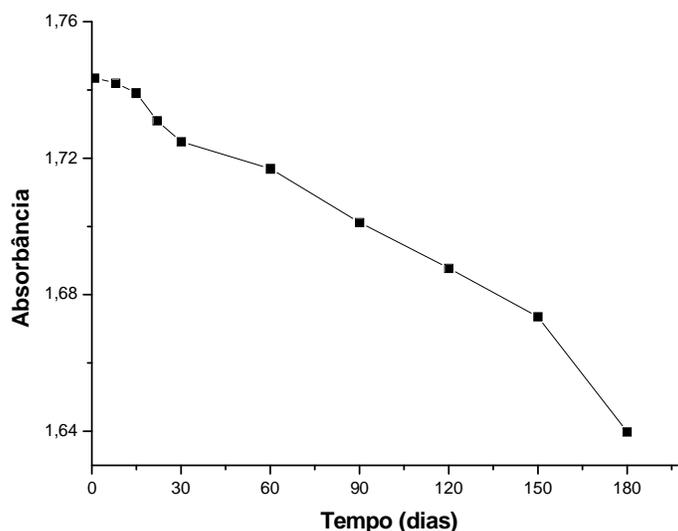


Figura 4.4 – Estudo da estabilidade do furfural na solução padrão após resfriamento.

Pode-se constatar a ocorrência de um decaimento da absorbância medida ao longo período. Este decaimento foi de 0,086%, 0,25% e 5,7% após 7, 15 e 180 dias, respectivamente. Na primeira semana, observa-se uma aceitável perda de analito. No entanto, a partir da segunda semana, a absorbância do analito sofre considerável perda, sendo assim, faz-se necessário, o preparo de uma nova solução padrão por meio do reagente recém destilado, a fim de, eliminar possíveis erros sistemáticos decorrentes do uso de soluções que subestimem a concentração do analito nas amostras.

4.4 Determinação de furfural

A razão entre o volume da fase hidroalcoólica e a fase extratora, governam a recuperação do analito, de modo que, o fator de recuperação foi analisado para escolher a proporção volumétrica entre solução padrão/amostra e solvente extrator. A [tabela 4.4](#) apresenta a relação entre a proporção (v:v) de solução padrão ($0,55 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) e solvente extrator com a recuperação do analito na fase extratora. A recuperação mostrou-se mais eficiente quando a proporção 1:1 (v:v) foi utilizada, desta forma, essa proporção foi escolhida para realização dos ensaios analíticos em virtude de se obter o máximo de analito extraído.

Tabela 4.4 - Efeito da proporção (solução padrão: solvente extrator) na recuperação do analito.

Proporção (v:v)	ER (%)
1,0: 1,0	101
1,0: 0,8	89
1,0: 0,4	91
1,0: 0,2	57

ER: recuperação do analito na fase extratora

O coeficiente de partição, K_p , foi definido como a razão da concentração de soluto na fase orgânica e na fase aquosa. O K_p calculado foi de 15,0 indicando assim, que grande parte do soluto foi transferida para fase extratora. Devido à configuração do método de extração, optou-se por um solvente com maior ponto de ebulição para que perdas por volatilização fossem evitadas. Outro motivo para uso deste solvente está na diferença de solubilidade entre o clorofórmio e água (presente na amostra). Além disso, o solvente escolhido é muito menos tóxico que a anilina, usada no método de Hewitt's e com maior potencial cancerígeno do que o clorofórmio, esse, por sua vez, é susceptível ao reuso após destilação.

Soluções padrões de furfural preparadas em 50% (v/v) de álcool etílico e amostras reais de cachaça foram submetidas à extração com clorofórmio na proporção 1:1 (v/v) a temperatura ambiente. Os resultados encontram-se nas [tabelas 4.5](#) e [4.6](#) e mostram que o método desenvolvido apresenta valores de concentração iguais ou bem próximos aos valores reais exprimindo boa exatidão.

Tabela 4.5 – Valores médios e incertezas das concentrações das soluções padrões (n=3) usando a metodologia proposta.

Teor presente (mg 100mL ⁻¹)	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Teor encontrado (mg 100mL ⁻¹)	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,1
Erro relativo	0,048	-0,019	0,002	0,035	0,026	0,070	0,004	0,003	-0,135

Tabela 4.6 – Valores médios e incertezas das concentrações das amostras de cachaça (n=3) para a determinação de furfural ($\text{mg } 100\text{mL}^{-1}$) usando a metodologia proposta e o método de referência.

Amostras	Referência \pm DP	LLE ¹	LLE ²	LLE ³	LLE ^M \pm DP
	($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$)				
C1	0,98 \pm 0,25	0,91	0,92	0,94	0,93 \pm 0,20
C2	1,11 \pm 0,24	1,00	1,00	1,01	1,01 \pm 0,07
C3	1,14 \pm 0,26	1,09	1,08	1,08	1,09 \pm 0,09
C4	1,12 \pm 0,34	1,03	1,02	1,06	1,04 \pm 0,36
C5	1,08 \pm 0,29	1,01	0,99	1,00	1,00 \pm 0,22
C6	1,08 \pm 0,26	1,01	1,01	1,02	1,01 \pm 0,03
C7	0,40 \pm 0,08	0,41	0,41	0,42	0,41 \pm 0,01
C8	0,50 \pm 0,11	0,51	0,50	0,51	0,51 \pm 0,03

LLE¹: Concentração encontrada após extração (primeira replicata); LLE²: Concentração encontrada após extração (segunda replicata); LLE³: Concentração encontrada após extração (terceira replicata); DP: desvio padrão.

Como o valor de F calculado (1,31) foi menor do que o F crítico (3,79), a 95% de significância, as variâncias podem ser consideradas iguais. Observa-se, portanto, uma satisfatória precisão dos resultados para o método proposto comparado ao de referência, visto que, os desvios não são significativamente diferentes.

A comparação estatística das médias foi realizada pelo teste t pareado para diferentes métodos. O valor de t calculado (0,42) foi comparado com o valor de t tabelado (2,36), para o nível de confiança de 95% e 7 graus de liberdade. Uma vez que t calculado < t crítico, os dois métodos fornecem resultados semelhantes, mostrando assim, que não existem diferenças significativas entre ambos.

Nas amostras de cachaça analisadas foram encontrados teores de furfural entre 0,4 e 1 $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$, estando pois, dentro do limite de 5 $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$, estabelecido pela Instrução Normativa Nº 13/2005 do MAPA (BRASIL, 2005).

SOUZA et al, 2009, analisaram 30 amostras de cachaças de cooperativas do estado do Rio de Janeiro. A soma dos teores de furfural e HMF variaram de 1,1 a 9,5 $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$, sendo que nove amostras continham teores acima do máximo permitido.

Teores máximos de 8,8 mg 100 mL⁻¹, para furfural, foram encontrados em amostras de cachaça artesanal de cana produzida a partir da matéria prima não queimada (MASSON et al., 2007).

PINHEIRO, 2010 analisou 16 amostras de cachaças. As mesmas encontravam-se dentro do limite máximo estabelecido, com valores menores que 1,0 mg 100 mL⁻¹.

4.5 Repetitividade

A precisão relacionada às medições realizadas, sob condições que podem ser repetidas, foi avaliada através da repetitividade tendo, $n = 3$, $t = 2,576$ e $S = 3,35 \cdot 10^{-5}$. Sendo que, o valor de S refere-se a média quadrática da variância residual. A maior diferença, no nível de confiança de 95%, entre os resultados obtidos nas condições de repetitividade, foi de 0,026. Como a repetitividade trata da dispersão dos resultados, pode-se inferir que, a diferença entre os resultados será menor que 0,026 diante das condições de repetitividade.

4.6 Testes de recuperação

Nos testes de recuperação, três amostras de cachaças foram utilizadas. Um volume de 2,0 mL de solução padrão com concentrações conhecidas de 0,6; 0,8 e 1,0 mg 100 mL⁻¹ foram adicionadas a 2,0 mL de amostra de cachaça. A **Tabela 4.7** apresenta os resultados obtidos para essas análises em porcentagem de recuperação e os respectivos coeficientes de variação.

Tabela 4.7 - Teste de recuperação de furfural em amostras de cachaças ($n = 3$).

Amostra	Recuperação (%)		
	0,6 (mg 100 mL ⁻¹)	0,8 (mg 100 mL ⁻¹)	1,0 (mg 100 mL ⁻¹)
C7	100,6 ± 0,59	106,2 ± 1,65	104,1 ± 1,47
C5	102,3 ± 0,96	100,8 ± 1,08	104,5 ± 2,64
C3	104,6 ± 1,19	108,9 ± 0,68	101,0 ± 1,01

Os resultados obtidos pelo teste de recuperação, para cada uma das amostras, encontram-se dentro da faixa de 102,3% a 108,9%. Os valores, sugeridos pelo manual da Associação Oficial de Química Analítica (AOAC) mostram que, para esse nível de concentração, a recuperação é considerada aceitável dentro da faixa de 80 a 110% (BRITO, 2003).

Os resultados estatísticos obtidos corroboram para a validação do método indicando a viabilidade do procedimento e confiabilidade das medidas com base na metodologia proposta.

4.7 Tratamento do resíduo

Nesta etapa, o clorofórmio foi purificado segundo a metodologia descrita por pesquisadores da EMBRAPA. O solvente extrator foi filtrado com alumina à pressão reduzida para remoção de possíveis componentes polares presentes. O filtrado foi posto sob agitação com lentilhas de NaOH. Procedeu-se com a filtração e lavagem com água deionizada na proporção 1:1 (v/v) até que o pH da fase aquosa fosse aproximadamente igual ao da água pura (pH 5 a 6) afim de eliminar resíduos e neutralizar espécies altamente reativas formadas durante a etapa de neutralização. O clorofórmio foi então, armazenado em frasco âmbar contendo sulfato de sódio anidro como agente secante. Em seguida, a destilação fracionada foi realizada. Pode-se observar, na **figura 4.5**, o espectro do resíduo antes (R) e após a etapa do tratamento (T).

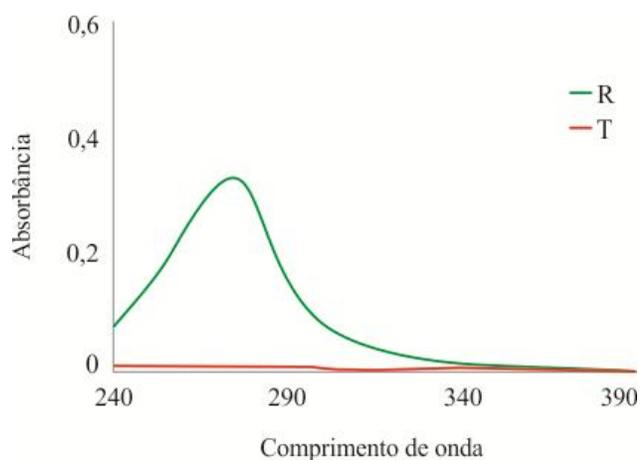


Figura 4.5 – Espectros do resíduo antes e após o tratamento. R representa o resíduo antes do tratamento e T, o resíduo tratado.

Após a etapa de tratamento, observa-se uma linearidade com relação ao branco medido (clorofórmio). Sendo assim, o solvente obtido após essas etapas de tratamento, pode ser reutilizado para novas extrações e para separações em colunas cromatográficas contribuindo assim, para a redução na geração de resíduos e diminuição de custo nas análises (EMBRAPA, 2014a).

Capítulo

5

Um Método Espectrofotométrico para
Quantificação de Furfural em Cachaças por
Extração Líquido-Líquido

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusão

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de uma metodologia analítica baseada na extração líquido-líquido e detecção UV para quantificação de furfural e HMF, expresso como furfural, em amostras de cachaças. De modo que, os procedimentos adotados foram simples, rápidos e de baixo custo.

O modelo mostrou-se estatisticamente significativo, evidenciando a existência de uma relação linear entre as variáveis y e x . Quando comparado ao F crítico, o modelo mostrou-se bem ajustado sendo, pois, apropriado para explicar a relação entre a concentração e o sinal medido.

A comparação dos resultados obtidos com os fornecidos por GC-FID, mostraram uma satisfatória precisão avaliados pelos testes F e t que comprovam não haver diferenças significativas entre os métodos no nível de 95% confiança. Os testes de recuperação apresentam resultados variando de 102 a 109%, valores aceitos para a faixa de concentração avaliada.

Dessa forma, o método proposto permitiu a determinação dos teores de furfural nas amostras de cachaças apresentando baixo consumo de reagente, reduzido tempo de análise, volume mínimo de resíduos gerados ao meio ambiente já que o solvente extrator foi recuperado podendo então, ser reutilizado. Convém ainda salienta que as amostras de cachaças não precisaram de pré-tratamento e que a repetitividade do método foi satisfatória.

Portanto, a metodologia proposta apresenta-se como uma nova estratégia para análise de furfural em cachaças sem a necessidade de prévio tratamento das amostras reduzindo assim, as etapas de análise e erros inerentes as mesmas. Além disso, a análise é executada em poucos minutos sem a utilização de equipamentos sofisticados. Assim, as características analíticas do método proposto, o qualificam como potencialmente útil para determinação de furfural em amostras de cachaças.

5.2 Perspectivas

Tendo em vista as vantajosas características apresentadas do método de extração líquido-líquido (LLE) na determinação de furfural em amostras de cachaças, esta pesquisa tem como perspectivas:

- Aplicar o método de LLE para determinação de furfural em outras matrizes de bebidas;
- Aplicar a metodologia de LLE em amostras de cachaças para outras determinações analíticas;
- Estudar a possibilidade de várias outras determinações analíticas através do uso de diferentes etapas de extração;
- Automatizar a metodologia descrita reduzindo ainda mais o consumo de reagente e o tempo de análise.

Referências

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. G. Corante caramelo utilizado em refrigerantes: caracterização físico-química e compostos voláteis. São Caetano do Sul. Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia. **2011**.
- ALVES, H. O. Obtenção e análise físico-química do destilado alcoólico da cajarana (*spondias* sp) no semiárido paraibano. Patos. Universidade Federal de Campina Grande, **2011**.
- ANTAL, M.J.J.; MOK, W. S. L. Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose. *Carbohydr. Res.* 199: **91, 1990**.
- ANTAL, M. J. J., LEESOMBOON, T.; MOK, W. S. Mechanism of formation of 2-furaldehyde from D-xylose. *Carbohydr. Res.* **217: 71, 1991**.
- ANVISA. Guia para qualidade em química analítica. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/laboratorios.pdf>> Acesso em: **01/03/2014**.
- AQUINO, F. W. B.; AMORIM, A. G. N.; PRATA, L. F., NASCIMENTO, R. F. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **24: 032, 2004**.
- ARAÚJO, L. D. Análise sensorial descritiva de cachaça: proposta de um protocolo preliminar para avaliação da qualidade da bebida. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, **2010**.
- AUSTRALIAN. Rural Industries Research and Development Corporation. *Furfural Chemicals and Biofuels from Agriculture*. Novembro, 2006. Disponível em: <<https://rirdc.infoservices.com.au/items/06-127>>. Acesso em: **15/08/2013**.
- AZEVEDO, L. C. et al; Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Quim. Nova.* **30: 1968, 2007**.
- BLAU, K.; HALKET, J. *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2a ed.; Wiley, Ed.; England, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e cachaça. Diário Oficial da União. Brasília, **30/06/2005**.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 1, de 29 de janeiro de 2007. Critérios para credenciamento, reconhecimento, extensão de escopo e monitoramento de laboratórios no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento - mapa. Diário Oficial da União. Brasília, **17/01/2007**.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 577, de 27 de dezembro de 2010. Guia de validação e controle de qualidade analítica. Brasília. Mapa/ACS, **2011, p.72.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA nº 32, de 13 de março de 2012. LABTOX - Laboratório de análises de agrotóxicos e bebidas alcoólicas. Diário Oficial da União. Brasília, **15/03/2012.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Manual de Operacional de bebidas vinagres. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/laboratorios/publicacoes>>. Acesso em: **10/06/2012.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 4062 de 21 de dezembro de 2001. Disponível em < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1014>> Acesso em: **16/02/2014.**

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente. **13: 129, 2003.**

CABUK, H.; KÖKTÜRK. M. Low Density Solvent-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Synthetic Antioxidants in Beverages by High-Performance Liquid Chromatography. The ScientificWorld Journal. **2013**, p.8.

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. Quim. Nova. **34: 1604, 2011.**

CHEN, F; YUAN, J-P. Separation and Identification of Furanic Compounds in Fruit Juices and Drinks by High-Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection *J. Agric. Food Chem.* **46: 1286, 1998.**

DEL GRANDE. M. Cromatografia gasosa princípios básicos. Disponível em <<http://www.cpatc.embrapa.br/eventos/seminariodequimica/1%B0%20Minicurso%20Produ%E7%E3o%20e%20Qualidade%20de%20Biodiesel/cromatografiagasosa.pdf>>. Acesso em **27/11/2013.**

DOBRINAS, S.; STANCIU, G.; SOCEANU, A. Analytical characterization of three distilled drinks. Ovidius University Annals of Chemistry. **20: 48, 2009.**

DRAGONE, G. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. Food Chemistry. **112: 929, 2009.**

- DUCAN, P. S.; PIGGOTT, J. R.; *Science of Technology of Whiskies*, Longman Scientific Technical. New York, 1989.
- EBELER, S. E.; TERRIEN, M. B.; BUTZKE, C. E. Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction. *J Sci Food Agric* **80**: 625, 2000.
- EDYE, L.A.; CLARKE, M.A. Sucrose loss and color formation in evaporators. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* **22**: 238, 1995.
- EMBRAPA. Metodologia para tratamento de clorofórmio comercial para uso em separações cromatográfica. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/74946/1/pub-145.pdf>>. Acesso em: **01/02/2014**.
- EMBRAPA. Árvore do conhecimento cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html>>. Acesso em: **21/02/2014**.
- FACCHIN, I; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. *Quím.Nova*, **21**: 60, 1998.
- VILELA, A. F. Estudo da adequação de critérios de boas práticas de fabricação na avaliação de fábricas de cachaça de alambique. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.
- FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA. Segundo a Directiva 2001/58/CE da Comissão das Comunidades Europeias. Disponível em: <http://www.furan.com/_resources/downloads/10195pt_rev6.pdf>. Acesso em: **25/03/2012**.
- GASPAR, E. M. S. M.; LOPES, J. F. Simple gas chromatographic method for furfural analysis. *Journal of Chromatography A*. **1216**: 2762, 2009.
- GOMES, P. C. A. C. Doseamento simultâneo de aldeídos furânicos (5HMF e furfural), ácido 5-O-cafeoilquínico e cafeína em café verde e torrado - Ensaio de termodegradação do 5HMF. Porto, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 1997.
- GOULART, S. M.; ALVES, R. D. A.; PAULA, W. X.; QUEIROZ, J. H.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Determination of Carbamates in Beverages by Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and Liquid Chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.*, **23**: 1154, 2012.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Quim. Nova*. **32**: 1500, 2009.

- GUIDANCE FOR INDUSTRY. Q2B validation of analytical procedures: methodology. 1^a ed.: International Conference on Harmonisation, **1996**.
- HAMERSKI, F. Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, **2009**.
- HO, P.; HOGG, T. A.; SILVA, M. C. M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. *Food Chemistry*. **64: 115, 1999**.
- INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. Fev, **2010**.
- INMETRO. Orientação para a seleção e uso de materiais de referência. DOQ-CGCRE-016. Fev, **2010**.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo, 2008, p. 427
- KHABAROV, Y. G. et al. A New Spectrophotometric Method for Determination of Furfural and Pentoses. *Russian journal of applied chemistry*. **79, 2006**.
- KITTS, D. D.; WU, C. H.; KOPEC, A.; NAGASAWA, T. Chemistry and genotoxicity of caramelized sucrose. *Molecular Nutrition & Food Research*. **50: 1180, 2006**.
- KROH, L. W. Caramélisation in food and beverages. *Food Chem*. **51: 373, 1994**.
- LÉAUTE, R. Distillation in alembiq. *American Journal of Enology and Viticulture*. **41: 30, 1990**.
- LEE, H. S.; NAGY, S. Quality changes and nonenzymatic browning intermediates in grapefruit juice during storage. *J. Food Sci*. **53: 168, 1988**.
- LEITZ, J.; KUBALLA, T.; REHM, J.; LACHENMEIER, D. W. Chemical Analysis and Risk Assessment of Diethyl Phthalate in Alcoholic Beverages with Special Regard to Unrecorded Alcohol. *PLoS ONE*. **4: 8127, 2009**.
- Li, M. et al. Determination of Furfural in Beer by HighPerformance Liquid Chromatography with Solid-Phase Extraction. *J. Inst. Brew*. **115: 226, 2009**.
- LIU, F. Separation and purification of valuable chemicals from simulated hydrothermal conversion product solution. Ontario- Canadá. University of Waterloo. 2012.
- MADRERA R. R.; VALLES, B. S.; Determination of Volatile Compounds in Cider Spirits by Gas Chromatography with Direct Injection. *Journal of Chromatographic Science*. **45, 2007**.
- MADRAKIAN, T.; GHAZIZADEH, F. Micelle-mediated Extraction and Determination of Tin in Soft Drink and Water Samples. *J. Braz. Chem. Soc*. **20: 1535, 2009**.

- MAIA, A. B. R. A. Componentes secundários da aguardente. STAB. Açúcar, álcool e subprodutos. **12: 29, 1994.**
- MANSILLA, A. E., SALINAS, F. AND NEVADO, J. J. B. (1992). Differential determination of furfural and hydroxymethylfurfural by derivative spectrophotometry. J. AOAC Int. **75: 678, 1992.**
- MANSILLA, A. E.; DURÁN-MERÁS, I.; LOPEZ, F. S. Kinetic Determination of 2-Furfuraldehyde Based in a Modified Winkler's Method. J. Agric. Food Chem. **44: 2962, 1996.**
- MANSILLA, A. E.; SALINAS, F.; NEVADO, J. J. Simultaneous determination of pesticides by multivariate spectral analysis and derivative spectrophotometry. Journal of AOAC. **75: 678, 1992.**
- MASSON, J. et al; Parâmetros físico- químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. Ciênc. Agrotec. **31: 1805, 2007.**
- MANTELATTO, P. E. Estudo do processo de cristalização de soluções impuras de sacarose de cana-de-açúcar por resfriamento. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, **2005.**
- MERCK. Anilina. Disponível em <<http://www.merckmillipore.com/brazil/chemicals/anilina>>. Acesso em: **05/05/2012.**
- MONTANÉ, D. et al. High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production. *Biomass and Bioenergy* **22: 295, 2002.**
- MONTES, R. et al. Solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the sensitive determination of selected fungicides in wine. *Journal of Chromatography A*. 1216: 5459, 2009.
- MORALES, F. J. N., ROMENO, C. E.; JIMINEZ, S. P. Presencia de 5-hidroximetilfurfural en leche tratada termicamente. *Alimentation, equipos y tecnologia*. **13: 43, 1994.**
- MORÉS, S. Determinação de compostos voláteis em cachaça por microextração em fase sólida. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, **2009.**
- MUTTON, M. J. R.; MARTÍNEZ, J. V. B. I.; MUTTON, M. A. Influência da Matéria-prima e do Processamento Sobre a Composição e Qualidade da Aguardente Produzida em Escala Industrial. Disponível em <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:_EeYDLfzo3QJ:www.enq.ufsc.br/ventos/sinaferm/trabalhos_completos/t264.doc+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br> Acesso em: **02/12/2012.**

- NAGATO, L. A. F. et al. Quantitation of ethyl carbamate by gás chromatography and mass spectrometry detection in distilled spirits. *Alimentaria*. **2000**, p. **31**.
- NASCIMENTO, R. F. Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **18**, **1998**.
- NASCIMENTO, R. F. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. *Quím. Nova*. **21**: **735**, **1998**.
- NASCIMENTO, R. F. et al. Avaliação do tratamento térmico na composição química e na qualidade da cajuína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **23**: **217**, **2003**.
- NESCATELLI, R. Food quality control and authentication through coupling chemometrics to instrumental fingerprinting techniques. *Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali. Università di Roma*. Disponível em <<http://padis.uniroma1.it/handle/10805/2221>> Acesso em: **01/03/2014**.
- NÓBREGA, I. C. C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do “headspace” e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **23**: **210**, **2003**.
- NOVAES, F. V. Primeiro curso de extensão em aguardente de cana. Piracicaba: ESALQ, 1974.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, **74**: **69**, **2000**.
- PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. *Spectrochimica Acta* **64**: **1**, **2009**.
- PEREIRA, N. E.; CARDOSO, M. G.; AZEVEDO, S. M.; MORAIS, A. R.; FERNANDES, W. AGUIAR, P. M. Compostos secundários em cachaças produzidas no estado de minas gerais. *Ciênc. agrotec.* **27**: **1068**, **2003**.
- PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos, *Quim. Nova*. **19**: **268**, **1996**.
- PINHEIRO, S. H. M. Avaliação sensorial das bebidas aguardente industrial de cana-de-açúcar e cachaça de alambique: uma contribuição para o desenvolvimento de um protocolo de análise. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. **2010**.
- PORTE, A. REZENDE, C.M.; ANTUNES, O.A.C. Produção de voláteis via sistema modelo

- de Maillard usando glucose e l-aminoácidos sob diferentes condições de pH. *Revista Universidade Rural. Série Ciências Exatas e da Terra*. **26: 12, 2007.**
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*. **24: 68, 2001.**
- RIBEIRO, F.A.L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados, *Quim. Nova*. **31: 164, 2008.**
- RIBEIRO, P. R.; Carvalho, J. R. M.; Geris, R.; Queiroz, V.; Fascio, M. Furfural – da biomassa ao laboratório de química orgânica. *Quim. Nova*. **35: 1046, 2012.**
- ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Quím. Nova*. **27: 807, 2004.**
- SAKAI, R. H. Cachaça. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html>>. Acesso em: **29/03/2012.**
- SAMPAIO, M. R. F. Otimização e validação de métodos empregando QuEChERS modificado, LC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em derivados da cana-de-açúcar. Rio Grande. Universidade Federal do Rio Grande. **2011.**
- SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde. Disponível em: <<http://datasheets.scbt.com/sc-210345.pdf>>. Acesso em: **05/12/2012.**
- SCHEIRS, J; CAMINO, G.; AVIDANO, M.; TUMIATTI, W. Origin of furanic compounds in thermal degradation of cellulosic insulating paper. *J. Appl. Polym. Sci*. **69: 2541, 1998.**
- SILVA, A. P.; ALVES, M. C.C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. ENQUALAB-2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/60589749/COMO-INICIAR-A-VALIDACAO-DE-METODOS-ANALITICOS>>. Acesso em: **15/10/2013.**
- SILVA, O. G. Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar. Araçatuba, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, **2010.**
- SINGLETON, V. L. Maturation of wines and spirits: comparison, facts and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*. **46: 98, 1995.**
- SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de Química Analítica. Tradução da 8ª Edição norte-americana. Editora Thomson. São Paulo. **2006.**
- SORATTO, A. N.; VARVAKIS, G.; HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. **27: 681, 2007.**

- SOUZA, L. M. et al. Teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas na região norte fluminense – Rio de Janeiro. *Quim. Nova.* **32: 2304, 2009.**
- SOUZA, M. D. C. V. Identificação, quantificação e comparação das substâncias químicas responsáveis pelos aromas da cachaça de alambique e do rum comercial tratados pelo processo de irradiação. São Paulo, IPEN, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, **2006.**
- SOUZA, J. Estudo da eficiência de alguns polielitrólitos utilizados na clarificação do caldo de cana. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, **1988.**
- VALENTE, I. M.; SANTOS, C. M.; MOREIRA, M. M.; RODRIGUES, J. A. New application of the QuEChERS methodology for the determination of volatile phenols in beverages by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1271: **27, 2013.**
- VOGEL. Practical organic chemistry. 5^a ed., Longman Group UK Limited. p. 156, **1989.**
- WIN, D. T. Furfural – Gold from Garbage. *AU Journal of Technology.* **8: 185, 2005.**
- WINKLER, O. Detection and determination of hydroxy-methylfurfuraldehyde in genuine and artificial honey. *Z. Lebensmitt.- Untersuch.* **102: 161, 1995.**
- WONG, D. W. S. in *Química de los alimentos. Mecanismos y teoría.* Cornell University, Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España. **117, 1989.**
- XU, X. et al. Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography *Talanta.* **85: 2632, 2011.**
- YOKOYA, F. Fabricação de aguardente de cana. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André TosLLEo. **1995. p.87.**
- YUAN, J-P.; CHEN, F. Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by hplc - dual detection. *Food Chemistry.* **64: 1423, 1999.**
- YUAN, J-P.; CHEN, F. Separation and Identification of Furanic Compounds in Fruit Juices and Drinks by High-Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection. *J. Agric. Food Chem.* **46: 1286, 1998.**
- ZACARONI, L. M. Compostos fenólicos e cumarinas: certificação de um método analítico para caracterização e quantificação em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira. Minas Gerais. Universidade Federal de Lavras. **2009.**
- ZAREI, A. R. Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Furfural in Water Samples After Mixed MicLLEe-Mediated Extraction. *Acta Chim. Slov.* **56: 322, 2009.**