

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
DETERMINAÇÃO DE 5-(HIDRÓXIMETIL)-2-FURALDEÍDO (HMF) EM  
ALIMENTOS COM ALTOS TEORES DE AÇÚCARES**

GUARAPUAVA

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
DETERMINAÇÃO DE 5-(HIDRÓXIMETIL)-2-FURALDEÍDO (HMF) EM  
ALIMENTOS COM ALTOS TEORES DE AÇÚCARES**

Dissertação de Mestrado

Jucimara Kulek de Andrade

GUARAPUAVA - PR

2014

JUCIMARA KULEK DE ANDRADE

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
DETERMINAÇÃO DE 5-(HIDRÓXIMETIL)-2-FURALDEÍDO (HMF) EM  
ALIMENTOS COM ALTOS TEORES DE AÇÚCARES**

Dissertação apresentada sob orientação da Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner, e sob co-orientação do prof. Dr. Marcos Roberto da Rosa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, na Universidade Estadual do Centro-Oeste

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner  
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto da Rosa

GUARAPUAVA - PR

2014

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

À minha família, minha mãe Maria Avani, meu pai Juarez e minha irmã Camila, por fazerem parte da minha vida, pelo apoio, incentivo e por estarem sempre ao meu lado me dando forças para alcançar meus objetivos.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner, pela orientação, ajuda, apoio incondicional, pelos ensinamentos e dedicação a mim concedidos durante todo o mestrado, e por ter acreditado e confiado em mim para que a realização deste trabalho fosse possível.

Ao prof. Dr. Marcos Roberto da Rosa pela co-orientação, apoio, ajuda, ensinamentos e contribuição para realização deste trabalho.

À Ms. Emy Komatsu e Profa. Dr. Hélène Perreault, da Universidade de Manitoba, no Canadá, pela contribuição na parte experimental, pela realização das análises de CLAE-UV das amostras estudadas, e pelo fornecimento de amostras provenientes do Canadá para análise.

À profa Dra Yohandra Reyes Torres por contribuir significativamente para este trabalho, na etapa experimental com conhecimentos sobre CLAE-UV.

Aos meus amigos, principalmente ao Chalder, Lidiane e Fernando que sempre estiveram ao meu lado, durante toda a graduação e durante esses dois anos de mestrado, pela amizade, por sempre me darem força, apoio e me ajudarem nos momentos mais difíceis.

À Camila Kulek de Andrade e Giseli Ducat, pelo apoio, pela grande contribuição e ajuda em diversas etapas desse trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica, Mariane, Adrilene e Fauller que contribuíram experimentalmente em etapas deste trabalho.

Aos colegas do LabGati.

À Capes e a Fundação Araucária pela bolsa concedida.

À Unicentro, e o Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, por permitirem que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

## RESUMO

Este trabalho apresenta a validação do método de CLAE-UV para a determinação de HMF em amostras de mel, xarope e melaço de cana e os estudos de otimização e validação de um novo método espectrofotométrico para a análise deste contaminante em xarope de glicose. Além disso, foi realizado também um estudo para avaliar se a composição química destes alimentos apresentava influência nos teores de HMF encontrados. Para confirmar a validação do método de CLAE-UV foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão que foram obtidos por diferentes técnicas estatísticas. Os resultados indicaram que o método investigado apresenta exatidão (taxas de recuperação entre 89 – 105%) e precisão (RSD para repetitividade e precisão intermediária entre 0,57% e 6,43%) adequadas. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de 0,09 e 0,26 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, foram baixos, demonstrando a sensibilidade do método de CLAE-UV. Foi observado também que o método apresenta uma boa linearidade na faixa de concentrações de 1,0 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>, com valores de  $F_{regressão}$  (62063,04) >  $F_{crítico}$  (4,067) e sem falta de ajuste do modelo linear ( $(F_{faj} (1,57) < F_{crítico} (2,839), p > 0,05)$ ). Além disso, a comparação dos cromatogramas e espectros UV-PDA do padrão de HMF e das amostras indica que o método apresenta uma boa seletividade. Portanto, o estudo de validação demonstrou que a metodologia cromatográfica pode ser considerada validada. O método espectrofotométrico foi otimizado com relação à concentração de metabissulfito de sódio e comprimento de onda. Os resultados indicaram a concentração de metabissulfito de sódio de 0,1% (m/v) e o comprimento de onda de 285 nm como condições ótimas. O estudo de validação foi realizado calculando-se os mesmos parâmetros adotados para o método de CLAE-UV, com exceção da seletividade. O método espectrofotométrico apresentou linearidade na faixa de 2,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup>, com  $F_{regressão}$  (12732,73) >  $F_{crítico}$  (4,667), sem falta de ajuste do modelo linear ( $(F_{faj} (0,04) < F_{crítico} (3,708), p > 0,05)$ ). Os valores de LD (0,101 mg L<sup>-1</sup>) e LQ (0,338 mg L<sup>-1</sup>) foram adequados, porém superiores aos observados para o método de CLAE-UV, demonstrando que esta metodologia analítica apresenta uma menor sensibilidade. Os resultados do estudo de precisão (RSD para repetitividade e precisão intermediária entre 0,296 % e 0,362 %) foram adequados para determinação de HMF em xarope de glicose estando dentro dos limites recomendados. A exatidão foi avaliada por meio da comparação dos teores de HMF obtidos pelo método espectrofotométrico com os obtidos pelo método de CLAE-UV pela aplicação de um teste-t pareado e uma análise de regressão linear no nível de 95% de confiança. Foi verificado que de acordo com os dois testes estatísticos realizados não existem diferenças significativas entre os métodos comparados, indicando que o método espectrofotométrico apresenta boa exatidão. Dessa forma, os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho para a determinação de HMF em mel, xarope de glicose e melaço de cana, foram eficientes e poderiam ser aplicados em análises de controle de qualidade, devido à facilidade de execução, rapidez e por não fazer uso de preparo de amostra. Para verificar se havia uma relação entre a composição química dos alimentos investigados (mel, melaço de cana e xarope de glicose) e os teores de HMF determinados por CLAE-UV foi aplicada uma Análise de Componentes Principais (ACP) aos teores de açúcares redutores, umidade, pH, acidez, condutividade elétrica e grau de escurecimento não enzimático medido pela absorbância em 420 nm. Os resultados dos ACPs mostraram que a CP1 conseguiu explicar satisfatoriamente a variabilidade entre os teores de HMF nos alimentos investigados e os fatores avaliados, para as três matrizes analisadas. O tempo de estocagem não foi importante na formação de HMF para nenhum dos alimentos estudados. Entretanto, todas as matrizes apresentaram influência da composição química (açúcar redutor, pH e acidez), bem como do grau de escurecimento não enzimático, que neste trabalho foi utilizado para avaliar a extensão do processamento térmico aplicado, o qual sugeriu que não há um controle de qualidade adequado para os alimentos investigados. Os teores de HMF foram influenciados também pelos teores de umidade nas amostras de xarope e pelos valores de condutividade elétrica nas amostras de melaço de cana.

**Palavras-chave:** HMF, CLAE-UV, espectrofotometria UV-Vis, validação de métodos, quimiometria, mel, xarope de glicose, melaço de cana

## ABSTRACT

This work presents the validation of HPLC-UV method for the determination of HMF in honey, syrup and cane molasses samples and optimization and validation studies of a new spectrophotometric method for the analysis of this contaminant in syrup. Furthermore, a work was also conducted to evaluate if the chemical composition of these foods had influence on HMF levels found. To confirm the validation of HPLC-UV method were evaluated parameters of selectivity, linearity, precision and accuracy obtained by different statistical techniques. The results indicated that the investigated method presents accuracy (recovery rates between 89-105 %) and precision (RSD for repeatability and intermediate precision between 0.57 % and 6.43 %) appropriate. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.09 and 0.26 mg L<sup>-1</sup>, respectively, were low, demonstrating the sensitivity of the HPLC-UV method. It was also observed that the method shows good linearity in the concentration range from 1.0 to 5.0 mg L<sup>-1</sup>, with values  $F_{regression} (62063.04) > F_{critical} (4.067)$  and without lack of fit of the linear model ( $(F_{lof} (1.57) < F_{critical} (2.839), p > 0.05)$ ). Furthermore, a comparison of chromatograms and UV-PDA spectra of the HMF standard and of the samples indicates that the method shows good selectivity. Therefore, the validation study demonstrated that the chromatographic methodology can be considered validated. The spectrophotometric was optimized with regard to the concentration of sodium metabisulphite and wavelength. The results showed the concentration of sodium metabisulphite 0.1 % (w/v) and the wavelength of 285 nm as optimal conditions. The validation study was performed calculating the same parameters adopted for the HPLC-UV method, with the exception of selectivity. The spectrophotometric method was linear in the range from 2.0 to 10.0 mg L<sup>-1</sup>, with  $F_{regression} (12732.73) > F_{critical} (4.667)$ , without lack of fit of the linear model ( $(F_{lof} (0.04) < F_{critical} (3.708), p > 0.05)$ ). The values of LOD (0.101 mg L<sup>-1</sup>) and LOQ (0.338 mg L<sup>-1</sup>) were adequate, nevertheless higher than ones observed for the HPLC-UV method, demonstrating that this analytical methodology presents a lower sensitivity. The results of the precision study (RSD for repeatability and intermediate precision between 0.296 % and 0.362 %) were suitable for the determination of HMF in syrup being within the recommended limits. The accuracy was assessed by comparing the levels of HMF obtained by the spectrophotometric method with those obtained by HPLC-UV method by applying a paired *t*-test and linear regression analysis at 95 % confidence. It was found that according to the two statistical tests there are not significant differences between the compared methods, indicating that the spectrophotometric method shows good accuracy. Thus, the analytical methods developed in this work for the determination of HMF in honey, syrup and cane molasses were efficient and could be applied in the analysis of quality control, due to ease of implementation, speed and why these not make use of sample preparation steps. To check whether there was a relationship between the chemical composition of the investigated foods (honey, cane molasses and syrup) and the levels of HMF determined by HPLC-UV has been applied Principal Component Analysis (PCA) for reducing sugars, moisture, pH, acidity, conductivity and degree of non-enzymatic browning measured by absorbance at 420 nm. The results of the PCA showed that PC1 could satisfactorily explain the variability in the HMF contents in the foods investigated and the factors evaluated for the three matrices analyzed. The storage time was not important for the formation of HMF in none of foods studied. However, all the matrices presented influence of chemical composition (reducing sugar, pH and acidity) and of degree of non-enzymatic browning, that in this work, was used as a measure of the extent of heat treatment applied, which it suggest that there is not a quality control of foods investigated. The levels of HMF were also influenced by moisture contents in syrup samples and by the electrical conductivity values in cane molasses samples.

**Keywords:** HMF, CLAE-UV, UV-Vis spectrophotometry, method validation, chemometrics, honey, syrup, cane molasses

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. Introdução</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2. Objetivos</b> .....	<b>16</b>
1.2.1. Objetivo Geral .....	16
1.2.2. Objetivos Específicos .....	16
<b>1.3. Referências</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O HMF</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1. Hidróximetilfurfuraldeído (5-(hidróximetil)-2-furaldeído – HMF)</b> .....	<b>19</b>
2.1.1. Estrutura e Propriedades .....	19
2.1.2. Distribuição do HMF nos Alimentos .....	20
2.1.3. Reações de Formação do HMF .....	21
2.1.3.1. Desidratação de Hexoses em Meio Ácido .....	22
2.1.3.2. Reação de Maillard .....	22
2.1.3.3. Caramelização .....	24
2.1.4. Aplicação do HMF como Indicador de Qualidade nos Alimentos .....	25
2.1.5. Toxicidade .....	25
2.1.6. Referências .....	26
<b>CAPÍTULO 3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HMF EM ALIMENTOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1. Métodos Espectrofotométricos</b> .....	<b>30</b>
3.1.1. Método Espectrofotométrico Modificado de Winkler (1955) .....	30
3.1.2. Método Espectrofotométrico Modificado de White (1979) .....	31
<b>3.2. Métodos Cromatográficos</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3. Aspectos Gerais sobre Validação de Métodos</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4. Referências</b> .....	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO 4. AMOSTRAGEM</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1. Amostras de Mel</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2. Amostras de Xarope</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3. Amostras de Melaço de Cana</b> .....	<b>49</b>
<b>4.4. Referências</b> .....	<b>51</b>

<b>CAPÍTULO 5. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DO MÉTODO DE CLAE-UV PARA DETERMINAÇÃO DE HMF EM MEL, XAROPE E MELAÇO DE CANA .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1. Materiais e métodos .....</b>	<b>55</b>
5.1.1. Amostras .....	55
5.1.2. Determinação de HMF por CLAE-UV .....	55
5.1.2.1. Reagentes .....	55
5.1.2.2. Equipamento e Condições de Análise .....	55
5.1.2.3. Preparo das Soluções das Amostras .....	56
5.1.2.4. Validação Intralaboratorial do Método de CLAE-UV para Determinação de HMF em Mel, Xarope e Melaço de Cana .....	56
5.1.2.4.1. Seletividade .....	56
5.1.2.4.2. Linearidade .....	57
5.1.2.4.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....	57
5.1.2.4.4. Precisão .....	57
5.1.2.4.5. Exatidão .....	58
5.1.2.5. Análise Estatística .....	59
<b>5.2. Resultados e Discussão .....</b>	<b>59</b>
5.2.1. Seletividade .....	59
5.2.2. Linearidade .....	62
5.2.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) .....	63
5.2.4. Precisão .....	64
5.2.5. Exatidão .....	65
<b>5.3. Aplicação do Método Validado de CLAE-UV as Amostras de Mel, de Xarope e de Melaço de Cana .....</b>	<b>66</b>
<b>5.4. Conclusões parciais .....</b>	<b>69</b>
<b>5.5. Referências .....</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO 6. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE HMF EM XAROPE .....</b>	<b>72</b>
<b>6.1. Materiais e Métodos .....</b>	<b>74</b>
6.1.1. Amostras .....	74
6.1.2. Reagentes .....	74
6.1.3. Preparo das soluções .....	74
6.1.4. Equipamentos .....	75
6.1.5. Estudo de otimização .....	75
6.1.6. Determinação Espectrofotométrica de HMF em Xarope .....	76
6.1.7. Estudo de Validação Intralaboratorial .....	77
6.1.7.1. Linearidade .....	77
6.1.7.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) .....	78
6.1.7.3. Precisão .....	78
6.1.7.4. Exatidão .....	80

6.1.7.5. Análise Estatística .....	80
<b>6.2. Resultados e Discussão .....</b>	<b>80</b>
6.2.1. Estudo de Otimização .....	80
6.2.2. Validação Intralaboratorial do Método Espectrofotométrico para Determinação de HMF em Xarope .....	84
6.2.2.1. Linearidade .....	84
6.2.2.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) .....	86
6.2.2.3. Precisão .....	87
6.2.2.4. Exatidão .....	90
<b>6.3. Conclusões parciais .....</b>	<b>93</b>
<b>6.4. Referências .....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO 7. CORRELAÇÃO DO HMF COM A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MEL, DE XAROPE E DE MELAÇO DE CANA .....</b>	<b>95</b>
<b>7.1. Materiais e Métodos .....</b>	<b>97</b>
7.1.1. Análises Físico-Químicas .....	97
7.1.1.1. Açúcares Redutores .....	97
7.1.1.2. Umidade .....	97
7.1.1.3. pH .....	98
7.1.1.4. Grau de Escurecimento Não Enzimático .....	98
7.1.1.5. Acidez .....	99
7.1.1.6. Condutividade Elétrica .....	99
7.1.2. Análise de HMF .....	99
7.1.3. Análise Estatística .....	100
<b>7.2. Resultados e Discussão .....</b>	<b>100</b>
7.2.1. Análise de Componentes Principais de Mel .....	102
7.2.2. Análise de Componentes Principais de Xarope .....	106
7.2.3. Análise de Componentes Principais de Melaço de Cana .....	111
<b>7.3. Conclusões parciais .....</b>	<b>114</b>
<b>7.4. Referências .....</b>	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>118</b>
<b>CAPÍTULO 9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Fórmula Estrutural do HMF (Fonte: WROLSTAD, 2012) .....	19
<b>Figura 2.2.</b> Mecanismo de desidratação da glicose (hexose) em meio ácido (Fonte: WROLSTAD, 2012) .....	22
<b>Figura 2.3.</b> Etapas da Reação de Maillard (Fonte: modificado a partir de LORENZO, 2013) .....	23
<b>Figura 2.4.</b> Etapas do processo de caramelização (Fonte: modificado a partir de LORENZO, 2013) .....	24
<b>Figura 3.1.</b> Reação do HMF com o íon bissulfito .....	31
<b>Figura 3.2.</b> Espectro da solução aquosa de mel clarificada 2% (m/v) (—) e com adição de solução de bissulfito 0,2% (m/v) (- - -), e o espectro de diferença entre o primeiro (amostra (—)) e o segundo (referência (- - -)). (Fonte: WHITE, 1979) .....	32
<b>Figura 4.1.</b> Fotos das amostras de mel provenientes do Brasil e do Canadá .....	45
<b>Figura 4.2.</b> Fotos das amostras de xarope provenientes do Brasil e do Canadá .....	47
<b>Figura 4.3.</b> Ilustração do processo de obtenção do xarope de bordo (Fonte: WERNER, 2006) .....	49
<b>Figura 4.4.</b> Fotos das amostras de melaço de cana provenientes do Brasil e do Canadá .....	50
<b>Figura 5.1.</b> Cromatogramas detectados em 285 nm (A) do padrão de HMF, (B) do mel (M1), (C) do melaço de cana (MC1) e (D) do xarope de glicose (X1).....	60
<b>Figura 5.2.</b> Espectros UV-PDA do (A) padrão de HMF e das amostras de (B) mel (M1), (C) xarope de glicose (X1) e (D) melaço de cana (MC1) .....	61
<b>Figura 5.3.</b> Reta da regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos de predição (IP) a 95% de confiança para a curva de calibração do método de CLAE-UV .....	63
<b>Figura 6.1.</b> Fluxograma do procedimento de otimização da concentração de metabissulfito de sódio .....	76
<b>Figura 6.2.</b> Fluxograma do procedimento adotado para a determinação espectrofotométrica de HMF em amostras de xarope .....	77
<b>Figura 6.3.</b> Modelo hierárquico aplicado para obter estimativas da precisão intermediária do método espectrofotométrico de determinação de HMF em xarope.....	79
<b>Figura 6.4.</b> Espectros de varredura (A), da solução de metabissulfito de sódio 0,1%, m/v), (B) da solução de padrão de HMF 4,0 mg L <sup>-1</sup> (C) da solução amostra (solução	

de xarope 5,0 mg mL <sup>-1</sup> ) e da solução referência (solução de xarope após a adição da solução de metabissulfito de sódio) e (D) espectro resultante da subtração dos espectros mostrados em (C).....	81
<b>Figura 6.5.</b> Efeito da concentração de metabissulfito (% m/v) sobre a absorbância do HMF em 285 nm .....	83
<b>Figura 6.6.</b> Retas da regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos de predição (IP) a 95% de confiança para a curva de calibração do método espectrofotométrico .....	86
<b>Figura 6.7.</b> Retas da regressão linear entre os métodos de CLAE-UV e espectrofotométrico .....	93
<b>Figura 7.2.</b> Gráfico de pesos para a CP1 e CP2 obtidas com a análise multivariada dos dados para mel .....	104
<b>Figura 7.3.</b> Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos méis provenientes: do ● Brasil e do ● Canadá .....	104
<b>Figura 7.4.</b> Gráfico de pesos para a CP1 e CP2 obtidas pela análise multivariada dos dados para xarope .....	108
<b>Figura 7.5.</b> Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2 obtidas pela análise multivariada das amostras de xaropes provenientes: do ● Brasil e do ● Canadá .....	108
<b>Figura 7.6.</b> Gráfico de pesos para a CP1 e CP2 obtidas pela análise multivariada dos dados para melão de cana .....	112
<b>Figura 7.7.</b> Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2 obtidas pela análise multivariada das amostras de melão de cana provenientes: do ● Brasil e do ● Canadá .....	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Propriedades Físicas e Químicas do HMF .....	19
<b>Tabela 2.2.</b> Conteúdo de HMF em mg kg <sup>-1</sup> de alguns alimentos .....	20
<b>Tabela 4.1.</b> Informações e codificação das amostras de mel, xarope e melaço de cana .....	44
<b>Tabela 5.1.</b> Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança .....	62
<b>Tabela 5.2.</b> Resultados do estudo de precisão (repetitividade e precisão intermediária) e valor de Horrat para o método de CLAE-UV.....	64
<b>Tabela 5.3.</b> Valores de Recuperação (%) para determinação de HMF em mel, xarope de glicose e melaço de cana do método de CLAE-UV.....	66
<b>Tabela 5.4.</b> Teores de HMF de amostras de mel, xarope de glicose e melaço de cana determinados pelo método de CLAE-UV .....	67
<b>Tabela 5.5.</b> ANOVA e teste Tukey a 95% de confiança para os teores de HMF das amostras de mel, de xarope e de melaço de cana determinados por CLAE-UV.....	68
<b>Tabela 6.1.</b> Redução (%) da banda de absorção do HMF em 285 nm pela adição de soluções de metabissulfito de diferentes concentrações .....	84
<b>Tabela 6.2.</b> Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança .....	85
<b>Tabela 6.3.</b> Dados obtidos para o estudo de precisão .....	88
<b>Tabela 6.4.</b> ANOVA dos resultados do estudo de precisão .....	88
<b>Tabela 6.5.</b> Componentes de Variância, equações e suas estimativas para precisão intralaboratorial .....	89
<b>Tabela 6.6.</b> Precisão (repetitividade e precisão intermediária) e valor Horrat .....	90
<b>Tabela 6.7</b> Teores de HMF de amostras de xarope determinados pelos métodos de CLAE-UV e espectrofotométrico e teste- <i>t</i> pareado .....	90
<b>Tabela 6.8.</b> Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança .....	92
<b>Tabela 7.1.</b> Teores de HMF e dados de composição química das amostras de mel, xarope e melaço de cana .....	101
<b>Tabela 7.2.</b> Escores das variáveis HMF, açúcar redutor, umidade, grau de escurecimento não enzimático e acidez para as amostras de mel.....	103
<b>Tabela 7.3.</b> Escores das variáveis HMF, açúcares redutores, umidade, pH, grau de escurecimento não enzimático, condutividade elétrica e acidez para as amostras de	

xarope ..... 107

**Tabela 7.4.** Escores das variáveis HMF, açúcares redutores, umidade, pH, grau de escurecimento não enzimático, condutividade elétrica e acidez para as amostras de melação de cana ..... 111

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Espectrometria de Massas
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção no Ultra-Violeta
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CRONAT	Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais
CV	Coefficiente de variação
DE	Equivalente de dextrose
$F_{faj}$	$F$ para falta de ajuste
$F_{obs}$	$F$ observado
$F_{regressão}$	$F$ para regressão
g.l.	Graus de liberdade
HMF	5-(hidróximetil)-2-furaldeído ou hidróximetilfurfuraldeído
IC	Intervalo de confiança
ICH	International Conference on Harmonisation
ID	Identificação das amostras
IFFJP	International Federation of Fruit Juice Producers (Federação Internacional de Processadores de Suco de Frutas)
IHC	International Honey Commission (Comissão Internacional de Mel)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IP	Intervalo de predição
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LabGati	Laboratório de Análise de Traços e Instrumentação
LD	Limite de Detecção

LQ	Limite de Quantificação
MECK	Micellar electrokinetic chromatography (Cromatografia Eletrocínica Capilar Micelar)
ACP	Análise de Componentes Principais (Principal Components Analysis)
CPs	Componentes principais
CP1	Primeiro componente principal
CP2	Segundo componente principal
pH	Potencial Hidrognênico
PRM	Produtos da Reação de Maillard
<i>p</i> -toluidina	para-toluidina
QM	Quadrado Médio
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
$R^2$	Coefficiente de determinação
Rec	Recuperação
RSD	Relative standard deviation (Desvio padrão relativo)
$RSD_{ri}$	Relative standard deviation (desvio padrão relativo para análises em dias diferentes)
$PRSD_R$	Among-laboratory predicted relative standard deviation (desvio padrão relativo predito entre laboratórios)
$s^2$	Variância
SMF	Sulfoximetilfurfural
SQ	Soma dos Quadrados
UV	Ultra-Violeta
UV-PDA	Ultra-Violeta com arranjo de diodos
5-CMF	5-Clorometilfurfural

## **CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

### 1.1. Introdução

Atualmente, o estilo de vida moderno tem imposto à sociedade a necessidade do processamento térmico dos alimentos com o objetivo de obter um produto final com melhor qualidade e maior durabilidade.

O processamento térmico é muito importante na indústria alimentícia. Ele é utilizado em diversos alimentos, principalmente os ricos em carboidratos, como mel, açúcar mascavo, xarope de glicose, melaço de cana, sucos pasteurizados, biscoitos, pães, café, cereais matinais, alimentos infantis, vinho, frutas secas entre outros (TEIXIDÓ et al, 2011; RISNER et al., 2006; DURMAZ e GÖKMEN, 2010; SEVERIN et al., 2010; MAKAWI et al., 2009; JÖBSTL et al, 2010; GASPAR e LUCENA, 2009). Este visa melhorar as propriedades sensoriais dos produtos, ampliando assim, a gama de cores, sabores, aromas e texturas. Todavia, como este tipo de processamento envolve a aplicação de calor em operações tais como cozimento, torrefação, esterilização, pasteurização, entre outras, pode ocasionar também a perda de compostos termo lábeis e/ou formação de sabores e odores indesejáveis reduzindo o valor nutricional dos alimentos (GASPAR e LUCENA, 2009; CAPUANO e FOGLIANO, 2011; RADA-MENDOZA et al., 2002; KOWALSKI et al., 2013). Desta forma, a comunidade científica e a indústria alimentícia tem o desafio de controlar a estabilidade e qualidade dos alimentos industrializados, procurando detectar possíveis deteriorações e perda da qualidade nutricional, organoléptica e microbiológica. Para isso, faz uso de marcadores químicos para avaliar a qualidade e otimizar as condições do processamento térmico visando garantir a segurança alimentar.

A maior preocupação surgindo da aplicação do processamento térmico aos alimentos é a formação de compostos que não estão naturalmente presentes, mas que podem desenvolver-se durante o aquecimento ou processos de preservação e que tem impacto sobre a qualidade do produto ou apresentam efeitos prejudiciais à saúde. Recentemente, dois tipos de contaminantes têm recebido muita atenção devido ao seu elevado potencial toxicológico e sua ampla ocorrência nos alimentos: acrilamida e 5-(hidróximetil)-2-furaldeído (HMF) (CAPUANO e FOGLIANO, 2011). Sendo assim, devido ao crescente interesse da comunidade científica com relação aos efeitos potencialmente tóxicos do HMF e a sua utilização como indicador de qualidade, torna-se necessário desenvolver e validar

metodologias analíticas para a determinação deste contaminante em diferentes matrizes alimentares que possam ser adotados em qualquer laboratório de controle de qualidade (DURMAZ e GÖKMEN, 2010).

Os métodos espectrofotométricos modificados de White (1979) e de Winkler (1955) têm sido os mais utilizados ao longo dos anos e são normalmente os métodos oficiais para a determinação de HMF em alimentos como mel, uísque, vinho doce e xarope de uva, apesar do surgimento de metodologias analíticas mais precisas, exatas e sensíveis como as técnicas cromatográficas. Estes métodos são rápidos, mas tem baixa especificidade e sensibilidade porque o HMF é determinado diretamente na amostra, portanto, na presença de outras substâncias interferentes como aldeídos furânicos ou outros produtos decorrentes do aquecimento ou estocagem inadequada. Os métodos cromatográficos, por sua vez, apresentam uma melhor sensibilidade, devido à separação do analito de interesse para sua quantificação.

Na literatura podem ser encontrados vários estudos dedicados à determinação deste contaminante em mel. No entanto, são escassos os trabalhos relacionados à quantificação do HMF em xarope de glicose e melaço de cana bem como estudos de validação de metodologias analíticas cromatográficas e espectrofotométricas para estes alimentos. Estes fatos estimulam a realização de um estudo científico visando validar um método de CLAE-UV para determinação de HMF em amostras de mel, xarope de glicose e melaço de cana. Visto a utilização do método espectrofotométrico como método oficial para determinação de HMF em diversas matrizes e a inexistência de um método espectrofotométrico para análise deste contaminante em xarope de glicose torna-se importante otimizar e validar um método espectrofotométrico de absorção na região do UV pela aplicação de diferentes ferramentas quimiométricas.

Este trabalho foi estruturado em capítulos visando melhorar a compreensão do texto. Uma revisão bibliográfica é apresentada nos capítulos 2 e 3 abrangendo considerações gerais sobre o HMF bem como os métodos analíticos empregados para sua determinação em alimentos e aspectos gerais sobre validação de métodos com o intuito de situar o leitor dentro do problema que será abordado nos capítulos que se seguem. Nos capítulos 4 a 7 há descrições da parte experimental envolvendo materiais e métodos, além da análise estatística, resultados, discussão e considerações finais parciais. Informações pertinentes sobre as amostras são apresentadas no capítulo 4. Nos capítulos 5 a 7 serão apresentados o estudo de validação do método de CLAE-UV, os estudos de otimização e validação do método espectrofotométrico de absorção na região do UV e o estudo de correlação da composição

química de mel, de xarope e de melaço de cana com os teores de HMF encontrados. Nos capítulos 8 e 9 serão descritas as considerações finais e as perspectivas futuras do trabalho.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo Geral

Otimizar e validar metodologias analíticas para a determinação de HMF em alimentos com altos teores de açúcares pela aplicação de diferentes ferramentas quimiométricas.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Validar um método de CLAE-UV para determinação de HMF em amostras de mel, xarope e melaço de cana pela aplicação de diferentes testes estatísticos (*testes-t*, *teste-F*, ANOVA e regressão linear);
- ✓ Otimizar um método espectrofotométrico de absorção na região do UV para determinação de HMF em xarope;
- ✓ Validar o método espectrofotométrico de absorção na região do UV pela aplicação de diferentes testes estatísticos (*testes-t*, *teste-F*, ANOVA, planejamento hierárquico e regressão linear);
- ✓ Determinar o teor de HMF em diferentes amostras de mel, xarope de glicose e melaço de cana pelos métodos validados de CLAE-UV e espectrofotométrico;
- ✓ Determinar a composição química pela análise dos teores de açúcares redutores, umidade, pH, acidez e condutividade elétrica e o grau de escurecimento não enzimático medido pela absorbância em 420 nm das amostras de mel, xarope e melaço de cana;
- ✓ Correlacionar à composição química e o grau de escurecimento não enzimático das amostras de mel, xarope e melaço de cana com os teores de HMF pela aplicação da Análise de Componentes Principais.

### 1.3. Referências

- CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*. v. 44. p. 793-810. 2011.
- DURMAZ, G.; GÖKMEN, V. Determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural and 2-furfural in oils as indicators of heat pre-treatment. *Food Chemistry*. v. 123. p. 912-916. 2010.
- GASPAR, E. M. S. M.; LUCENA, A. F. F.; Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry*. v. 114. p. 1576–1582. 2009.
- JÖBSTL, D.; HUSØY, T.; ALEXANDER, J.; BJELLAAS, T.; LEITNER, E.; MURKOVIC, M. Analysis of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid (HMFA) the main metabolite of alimentary 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) with HPLC and GC in urine. *Food Chemistry*. v. 123. p. 814–818. 2010.
- KOWALSKI, S.; LUKASIEWICZ, M.; DUDA-CHODAK, A.; ZIEĆ, G. 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) – Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation: a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*. v. 63. p. 0-0. 2013.
- MAKAWI, S. Z. A.; TAHA, M. I.; ZAKARIA, B. A.; SIDDIG, B.; MAHMOD, H.; ELHUSSEIN, A. R. M.; KARIEM, E. <sup>a</sup> G.; Identification and quantification of 5-Hydroxymethyl Furfural HMF in some sugar-containing food products by HPLC. *Pakistan Journal Nutrition*. v. 8. n. 9. p. 1391-1396. 2009.
- RADA-MENDOZA, M.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chemistry*. v. 79. p. 513–516. 2002.
- RISNER, C. H.; KISER, M. J.; DUBE, M. F. An Aqueous High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey and Other Sugar-containing Materials. *Journal of Food Science*. v. 71. n. 3. p. 179-184. 2006.
- SEVERIN, I.; DUMONT, C.; CABATON, A. J.; GRAILLOT, V.; CHAGNON, M. C.; Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. *Toxicology Letters*. v. 192. p. 189–194. 2010.
- TEIXIDÓ, E.; NÚÑEZ, O.; SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry* v. 126. p. 1902–1908. 2011.
- WHITE, J. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. v.62. p.509-514. 1979.
- WINKLER, O. Beitrag zun Nachwals und zur Bestimmung von Oxymethylfurfural in Honig und Kunsthonig. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forshung*. n.3. v. 102. p. 161-167. 1955.

## **CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O HMF**

## 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O HMF

### 2.1. Hidróximetilfurfuraldeído (5-(hidróximetil)-2-furaldeído – HMF)

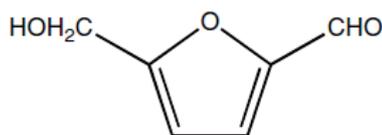
#### 2.1.1. Estrutura e propriedades

O hidróximetilfurfuraldeído (HMF) nomeado de acordo com a IUPAC como 5-(hidróximetil)-2-furaldeído é um composto orgânico sólido e incolor, altamente solúvel em água e que apresenta em sua estrutura um anel com cinco membros (furanose), e dois grupos funcionais ligados ao anel – um metil-álcool com grupo hidroxila (OH) e um aldeído (COH). É derivado da desidratação dos açúcares que pode ocorrer de três formas distintas: (1) desidratação de hexoses em ambientes ácidos, (2) produtos das reações de Maillard (escurecimento não enzimático) e a (3) caramelização (RISNER et al., 2006; THEOBALD et al., 1998, OETTERER et al., 2006). Algumas de suas propriedades são apresentadas na Tabela 2.1 e sua fórmula estrutural na Figura 2.1.

**Tabela 2.1.** Propriedades Físicas e Químicas do HMF.

Propriedades Físicas e Químicas		
Propriedade	Valor	Unidade
Fórmula molecular	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-
Massa molar	126,11	g/mol
Densidade	1,29	g/mL
Ponto de fusão	30-34	°C
Ponto de ebulição	114-116	°C
Índice de refração	1.5627 (a 18°C)	-
Solubilidade	Água, etanol, metanol, acetato de etila	-

(Fonte: KOWALSKI et al., 2013; LORENZO, 2013)



**Figura 2.1.** Fórmula estrutural do HMF (Fonte: WROLSTAD, 2012).

### 2.1.2. Distribuição do HMF nos Alimentos

O HMF é praticamente ausente nos alimentos frescos, mas seu conteúdo se eleva naturalmente em alimentos contendo açúcares durante tratamentos térmicos como secagem, torrefação, pasteurização e cozimento, durante a estocagem e especialmente em baixos valores de pH. Sendo assim, pode-se afirmar que a quantidade detectável de HMF em alimentos está diretamente relacionada à quantidade de calor aplicado durante o processamento e estocagem de alimentos com altos teores de açúcares. Outra fonte de HMF é representada pelos ingredientes utilizados na formulação de alimentos como as soluções de caramelo ou mel (CAPUANO e FOGLIANO, 2011).

A presença de HMF tem sido identificada em alimentos como malte, sucos e concentrados de frutas, frutas secas, café, vinagre balsâmico, produtos de panificação como pães e biscoitos, cereais matinais, mel, melaço de cana, açúcar de mesa, açúcar demerara e açúcar mascavo (Tabela 2.2).

**Tabela 2.2.** Conteúdo de HMF em mg kg<sup>-1</sup> de alguns alimentos.

Alimentos	Conteúdo de HMF (mg/kg)
Café em pó	100-1900
Café descafeinado	430-494
Café solúvel	400 - 4100
Mel	10,4 – 58,8
Cerveja	3,0 – 9,2 <sup>a</sup>
Doces em massa	5,5 – 37,7
Sucos de frutas	2,0 – 22,0
Biscoitos	0,5 – 74,5
Pão branco	3,4 – 68,8
Cereais matinais	6,9 – 240,5
Frutas secas	25 – 2900
Vinagre de vinho	0 – 21,5 <sup>a</sup>
Vinagre balsâmico	316,4 – 35251,3
Açúcar mascavo	23,3
Açúcar demerara	16,4
Melaço de cana	68 -184
Xarope de glicose	93 – 164
Caramelo	107,7

<sup>a</sup> – mg/L

Sua concentração em alimentos pode variar muito, algumas vezes, excedendo 1,0 g kg<sup>-1</sup> em certas frutas secas, vinagre balsâmico e café, como pode ser visto na Tabela 2.2

(RISNER et al., 2006; CAPUANO e FOGLIANO, 2011; THEOBALD et al., 1998; SPANO, et al., 2009; VORLOVÁ, et al., 2006; DURMAZ e GÖKMEN, 2010; AMEUR et al., 2006).

### **2.1.3. Reações de formação do HMF**

Os alimentos, quando mantidos na sua forma natural, sem processamento industrial sofrem algumas transformações devido ao fenômeno da fermentação. Isso torna o processo de aquecimento um importante fator na preservação dos mesmos, garantindo a qualidade e estabilidade do produto final (CAPUANO e FOGLIANO, 2011; GASPAR e LUCENA, 2009). Em vista disso, o processamento térmico é muito utilizado nas indústrias alimentícias. Ele é empregado em diversos alimentos, incluindo os ricos em açúcares, como é o caso do mel, açúcar mascavo, xarope de glicose de milho, melaço de cana, sucos pasteurizados, biscoitos, pães, café, alimentos infantis, vinho, entre outros (TEIXIDÓ et al, 2011; RISNER et al., 2006; DURMAZ e GÖKMEN, 2010; SEVERIN et al., 2010; MAKAWI et al., 2009; JÖBSTL et al, 2010; GASPAR e LUCENA, 2009).

Pode-se salientar também, que o processamento térmico é adotado, por proporcionar mudanças desejáveis nas características alimentícias, como a cor, o sabor, o aroma e a textura (CAPUANO e FOGLIANO, 2011; BELITZ et al., 2009), e também nas características físicas como a viscosidade (MIRI et al., 2008). Um dos exemplos mais comuns que pode ser citado é o processamento do mel, em que a aplicação de calor diminui sua viscosidade, além de impedir que ocorra a cristalização e fermentação do produto (SILVA et al., 2008; ZAPPALÀ et al., 2005).

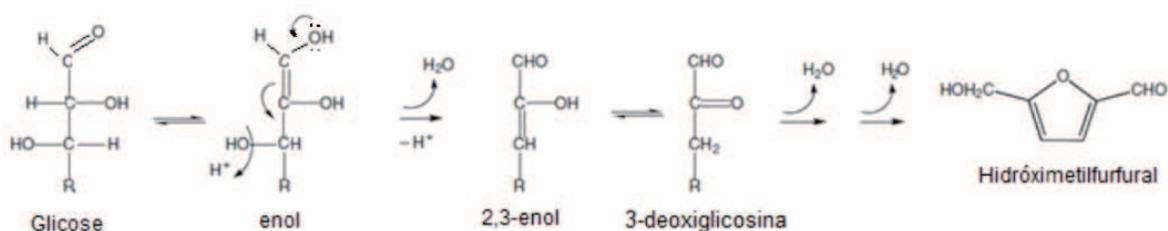
Durante o processamento dos alimentos, importantes modificações químicas podem ocorrer envolvendo os carboidratos. Entre estas se podem citar: desnaturação de proteínas, perda da estrutura granular do amido e formação de uma superfície marrom escuro, sendo esta última, um dos fenômenos que ocorre com maior frequência (GASPAR e LUCENA, 2009; AMEUR et al., 2006).

A aplicação do processamento térmico a alimentos que contém carboidratos promove a decomposição das hexoses, levando a formação de intermediários de coloração acastanhada, que pode ser observado imediatamente depois do processo de esterilização por aquecimento ou após um tempo de armazenamento (ULBRICHT et al., 1984). A formação dos intermediários (aldeídos furânicos) ocorre em determinadas condições: alta concentração de açúcares, baixos valores de pH, além da presença de ácidos orgânicos livres e baixa atividade da água (SPANO et al., 2009). As reações mais comuns e que estão envolvidas nos

tratamentos térmicos são a desidratação das hexoses em meio ácido, a reação de Maillard e a caramelização (RAMÍREZ-JIMENEZ et al., 2000).

### 2.1.3.1. Desidratação de hexoses em meio ácido

O aquecimento de alimentos contendo monossacarídeos em pH ácido, por meio de sucessivas desidratações das hexoses origina diversos compostos furanos e piranos (BELITZ et al., 2009). A reação de formação do HMF por desidratação de hexoses em meio ácido está representada na Figura 2.2.



**Figura 2.2.** Mecanismo de desidratação da glicose (hexose) em meio ácido. (Fonte: WROLSTAD, 2012)

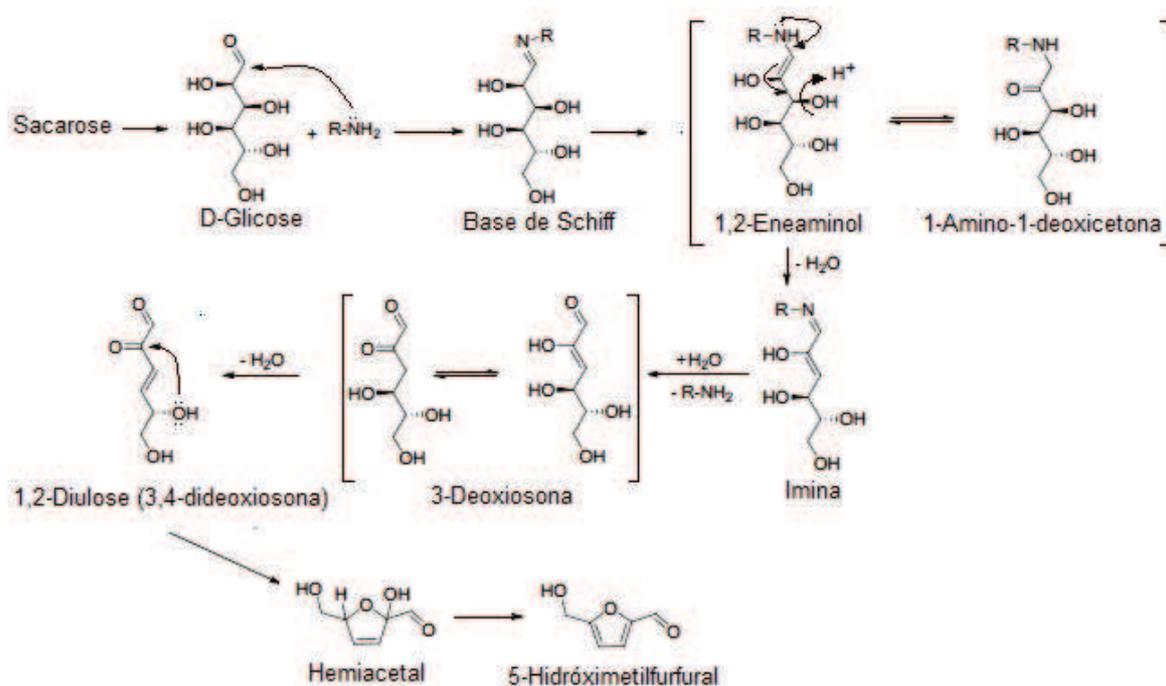
Os carboidratos, que contém o grupo aldeído (COH), também conhecidos como aldoses, sofrem desidratação por catálise ácida, resultando destas reações, compostos como deóxi açúcares e furfurais. Como mostrado na Figura 2.2, a desidratação da glicose, ocorre através de enolização 2-3 formando a 3-deoxiglicosina. No mecanismo representado, inicialmente a hidroxila no C3 é protonada, eliminando uma molécula de água, dando origem à forma 2-3 enol. A molécula 2,3-enol, por rearranjo ceto-enólico forma a 3-deoxiglicosina. Ao fim do processo, ocorre a desidratação, com liberação de moléculas de água, e assim, o fechamento do anel (WROLSTAD, 2012). Nesta etapa, forma-se o HMF a partir de monossacarídeos na forma de aldose e furfural a partir de pentoses.

### 2.1.3.2. Reação de Maillard

A reação de Maillard é uma reação de escurecimento não-enzimático, em que ocorre a formação do produto de coloração acastanhada, em alimentos onde há presença de grandes quantidades de açúcares (glicose e frutose) - e grupos amino de proteínas ou aminoácidos livres, através de uma reação de enolização, seguida da desidratação do açúcar (TEIXIDÓ et al., 2011; AMEUR et al., 2006; RAMÍREZ-JIMENEZ et al., 2000). Esta reação pode ocorrer,

durante o processamento dos alimentos, a altas temperaturas, mas também quando os mesmos são submetidos a um longo período de armazenamento (GASPAR e LUCENA, 2009).

A reação de Maillard foi estudada inicialmente em 1912 por Louis Maillard, sendo posteriormente, adaptada por outros estudiosos, como Amadori, Strecker e Cole (OETTERER et al., 2006; CUI, 2005; WROLSTAD, 2012). Esta reação inicia-se por meio da condensação do grupo amino proveniente de um aminoácido, peptídeo ou proteína, com o grupo carbonila de açúcares redutores. Após várias etapas, de reações complexas, há a formação dos Produtos da Reação de Maillard (PRM) (LORENZO, 2013). As etapas da reação de Maillard são representadas na Figura 2.3.



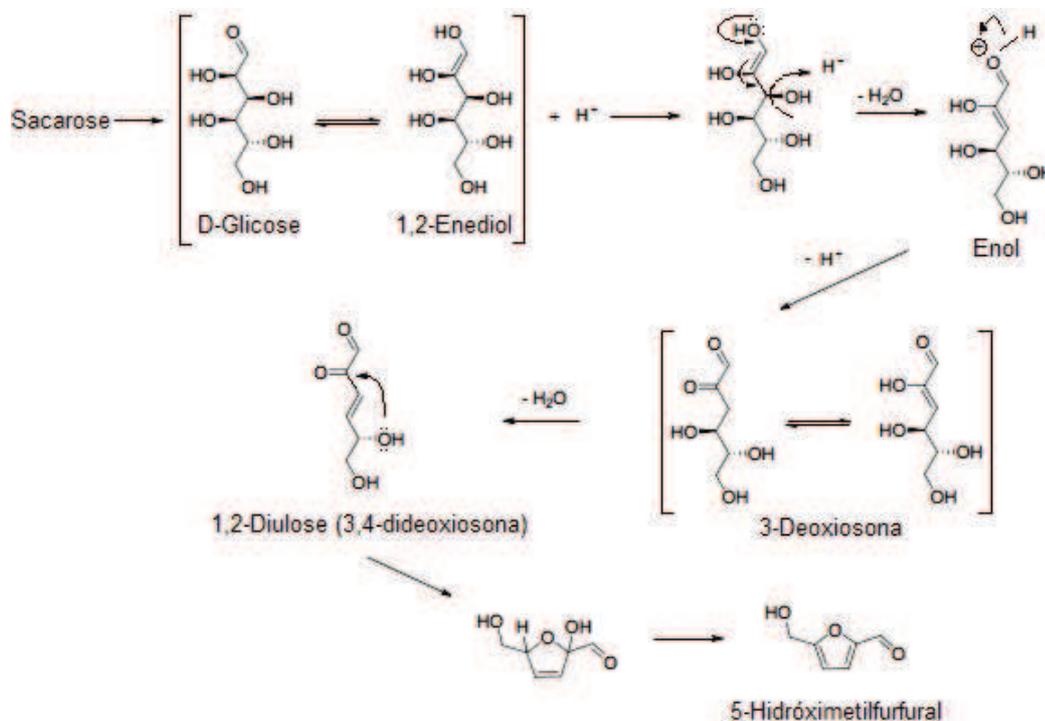
**Figura 2.3.** Etapas da Reação de Maillard (Fonte: modificado a partir de LORENZO, 2013)

Inicialmente a glicose condensa-se com o aminoácido, formando iminas (base de Schiff) (Figura 2.3). Em seguida, ocorre a tautomerização da imina, por rearranjo, formando o 1,2 eneaminol. Esta molécula, por equilíbrio ceto-enólico leva à obtenção de um composto aminocetose (1-amino-1-deoxicetona), conhecido como Composto de Amadori. Este composto em faixa de pH 4,0 a 7,0 é degradado à deoxiosonas (1, 3 ou 4-dioxidicarbonil). Assim, a perda de água da molécula de 1,2 eneaminol, seguida pela hidrólise da imina formada leva a formação da 3-deoxiosona, que posteriormente pode perder mais uma molécula de água formando a 3,4-dideoxiosona. A partir deste composto há a ciclização, por ataque nuclear intramolecular e formação do HMF (LORENZO, 2013; BELITZ et al., 2009; OETTERER et al., 2006).

Durante a reação de Maillard há também a formação de redutonas com alto poder redutor, além da liberação de  $\text{CO}_2$  devido a degradação dos aminoácidos e aldeídos. No final do processo, há a formação do aroma e alteração da cor e do sabor dos alimentos. A cor somente forma-se na etapa final, com a formação da melanoidina (OETTERER et al., 2006).

### 2.1.3.3. Caramelização

A caramelização é o processo em que ocorre a degradação dos carboidratos por reações de isomerização, enolização e desidratação, sendo que, para que esta reação ocorra, são necessárias temperaturas maiores do que para a reação de Maillard (AMEUR et. al., 2006; LORENZO, 2013). A Figura 2.4 apresenta as etapas do processo de caramelização.



**Figura 2.4.** Etapas do processo de caramelização (Fonte: modificado a partir de LORENZO, 2013)

No processo de caramelização dos alimentos ricos em carboidratos (Figura 2.4), o açúcar redutor, como a glicose e a frutose, em meio ácido ( $\text{H}^+$ ) tautomeriza por protonação inicial do oxigênio da carbonila. Nessa etapa é formado o 1,2-enediol que ao perder uma molécula de água forma um aldeído  $\alpha,\beta$ -insaturado, porém pouco estável por conter um álcool vinílico. Esse álcool tautomeriza à forma ceto mais estável. Somente então, há a perda de uma segunda molécula de água, com formação da 3,4-dideoxiosona. Esta última forma molecular, por adição nucleofílica intramolecular forma um hemiacetal cíclico que perde água e dá

origem ao HMF. Posteriormente, ocorre a polimerização, reação auto-catalizada pela água liberada nas etapas anteriores, levando a formação da melanoidina, que garante a coloração escura ao alimento. Essa reação depende de fatores como: reatividade do açúcar, temperatura, umidade e pH do meio (OETTERER et al., 2006; BELITZ et al., 2009).

#### **2.1.4. Aplicação do HMF como Indicador de Qualidade nos Alimentos**

A presença de HMF em alimentos tem sido atribuída à sua composição química e a aplicação de temperaturas excessivas durante o tratamento térmico e estocagem inadequada ou muito longa. Portanto, este tem sido utilizado como um indicador da qualidade do processamento em uma ampla variedade de alimentos contendo açúcares como frutas processadas, café, mel e leite (GASPAR e LUCENA, 2009; CAPUANO e FOGLIANO, 2011; VORLOVÁ et al., 2006; AMEUR et al., 2006).

Em geleias e produtos de frutas, a formação de HMF é um indicativo da eficácia do tratamento térmico na destruição de micro-organismos. Em produtos vegetais, como massas de tomates, o nível de deterioração pode ser determinado pelo conteúdo de HMF. Em suco de maçã e geleia de uva, o nível de HMF tem sido usado como um indicador da qualidade de estocagem em longo prazo (RADA-MENDOZA et al., 2002). Além disso, o HMF é usado também para o monitoramento dos processos de aquecimento aplicados a produtos a base de cereais tais como na secagem de massas, no forneamento de pães e biscoitos, na obtenção de torradas bem como na extrusão de cereais matinais (CAPUANO e FOGLIANO, 2011).

O Codex Alimentarius, através da Diretiva da Comunidade Européia 110/2001/CE de 20 de dezembro de 2001 (CE, 2002) estabeleceu um limite máximo para HMF em mel de 40,0 mg kg<sup>-1</sup> e de 50,0 mg kg<sup>-1</sup> em suco de maçã como um indicador de deterioração e tratamento térmico. A Federação Internacional de Processadores de Suco de Frutas (IFFJP) recomenda uma concentração máxima de 5,0 - 10,0 mg L<sup>-1</sup> de HMF em sucos de frutas e 25,0 mg L<sup>-1</sup> em concentrados de frutas (GASPAR e LUCENA, 2009; MURKOVIC e PICHLER, 2006; TEIXIDÓ et al., 2011).

#### **2.1.5. Toxicidade**

Uma das principais preocupações a cerca da formação de HMF em alimentos contendo altos teores de açúcares e que passam por processamentos térmicos é a potencial toxicidade

que este contaminante apresenta. Estudos reportam que este pode apresentar efeitos toxicológicos, podendo ser carcinogênico, mutagênico, citotóxico e genotóxico (CAPUANO e FOGLIANO, 2011; TRUZZI et al., 2012).

Estudos têm sido realizados em ratos, de modo a verificar a potencial toxicidade apresentada pelo HMF. Considera-se que a ingestão de HMF em altas concentrações pode apresentar efeitos citotóxicos, destruindo as células vivas e causando irritação nos olhos, no sistema respiratório e na pele. Estes estudos mostram também potenciais efeitos carcinogênicos apresentados pelo HMF que pode desencadear tumores de cólon em ratos e neoplasias intestinais (tumores de tecido epitelial no intestino) (CAPUANO e FOGLIANO, 2011; TOKER et al., 2013; KOWALSKI et al., 2013).

Outros trabalhos foram realizados para avaliar possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos do HMF em sistemas de bactérias, com e sem ativação metabólica. No entanto, não foram obtidos resultados de efeito mutagênico. Por outro lado, este contaminante pode se transformar em sulfoximetilfurfural (SMF), o qual segundo estudos apresenta efeito mutagênico e genotóxico, causando tumores na pele de camundongos, podendo formar adutos de DNA (aglomerados de células livres do DNA), além de efeito mutagênico para células de bactérias e de mamíferos (CAPUANO e FOGLIANO, 2011; TOKER et al., 2013).

O HMF pode formar ainda o 5-clorometilfurfural (5-CMF), sendo que este contaminante apresenta efeito mutagênico maior do que o SMF. A formação de 5-CMF ocorre no suco gástrico, devido à maior concentração de íons cloro. No entanto, não foram realizados estudos *in vitro* para este contaminante (CAPUANO e FOGLIANO, 2011; KOWALSKI et al., 2013).

De forma geral, estudos não concordantes, estimam valores variados para consumo de HMF/pessoa/dia sendo de 540,0 µg de HMF/pessoa/dia a 132,0 mg de HMF/pessoa/dia (CAPUANO e FOGLIANO, 2011).

#### **2.1.6. Referências**

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

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. 4 ed. Lichtenbergstraße: Springer, 2009.

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

CE-Comunidade Européia. Directiva 2001/110/CE de 20 de dezembro de 2001. Jornal Oficial das Comunidades Européias. 2002.

CUI, S. W. Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications. United States: Taylor & Francis Group, 2005.

DURMAZ, G.; GÖKMEN, V. Determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural and 2-furfural in oils as indicators of heat pre-treatment. *Food Chemistry*. v. 123. p. 912-916. 2010.

GASPAR, E. M. S. M.; LUCENA, A. F. F.; Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry*. v. 114. p. 1576–1582. 2009.

JÖBSTL, D.; HUSØY, T.; ALEXANDER, J.; BJELLAAS, T.; LEITNER, E.; MURKOVIC, M. Analysis of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid (HMFA) the main metabolite of alimentary 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) with HPLC and GC in urine. *Food Chemistry*. v. 123. p. 814–818. 2010.

KOWALSKI, S.; LUKASIEWICZ, M.; DUDA-CHODAK, A.; ZIEĆ, G. 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) – Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation: a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*. v. 63. p. 0-0. 2013.

LORENZO, G. A. Análisis Inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado em alimentos. 2013. 309f. Tese (Doutorado) – Universidade Complutense de Madrid, Madrid.

MAKAWI, S. Z. A.; TAHA, M. I.; ZAKARIA, B. A.; SIDDIG, B.; MAHMUD, H.; ELHUSSEIN, A. R. M.; KARIEM, E. <sup>a</sup> G.; Identificatiois and quantification of 5-Hydroxymethyl Furfural HMF in some sugar-containing food products by HPLC. *Pakistan Journal Nutrition*. v. 8. n. 9. p. 1391-1396. 2009.

MIRI, T.; TSOUKALAS, A.; BAKALIS, S.; PISTIKOPOULOS, E. N.; RUSTEM, B.; FRYER, P. J. Global optimization of process conditions in batch thermal sterilization of food. *Journal of Food Engineering*. v. 87. p. 485-494. 2008.

MURKOVIC, M.; PICHLER, N. Analysis of 5-hydroxymethylfurfual in coffee, dried fruits and urine. *Mol. Nutr. Food Research*. v. 50. p. 842-846. 2006.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. São Paulo: Manole, 2006.

RADA-MENDOZA, M.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chemistry*. v. 79. p. 513–516. 2002.

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

RISNER, C. H.; KISER, M. J.; DUBE, M. F. An Aqueous High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey and Other Sugar-containing Materials. *Journal of Food Science*. v. 71. n. 3. p. 179-184. 2006.

SEVERIN, I.; DUMONT, C.; CABATON, A. J.; GRAILLOT, V.; CHAGNON, M. C.; Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. *Toxicology Letters*. v. 192. p. 189–194. 2010.

SILVA, S. J. N. da; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEIN, M. H.; JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 28. p. 46-50. 2008.

SPANO, N.; CIULU, M.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SALIS, S.; SANNA, G. A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey. *Talanta*. v. 78. p. 310-314. 2009.

TEIXIDÓ, E.; NÚÑEZ, O.; SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry* v. 126. p. 1902–1908. 2011.

THEOBALD, A.; MULLER, A.; ANKLAM, E. Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Vinegar Samples by HPLC. *J. Agric. Food Chem*. v. 46. p. 1850-1854. 1998.

TOKER, O. S.; DOGAN, M.; ERSÖZ, N. B.; YILMAZ, M. T. Optimization of the content of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) formed in some molasses types: HPLC-DAD analysis to determine effect of different storage time and temperature levels. *Industrial Crops and Products*. v. 50. p. 137-144. 2013.

TRUZZI, C.; ANNIBALDI, A.; ILLUMINATI, S.; FINALE, C.; ROSSETTI, M.; SCARPONI, G. Determination of Very Low Levels of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) in Natural Honey: Comparison Between the HPLC Technique and the Spectrophotometric White Method. *Journal of Food Science*. v. 77. p. 784-790. 2012.

ULBRICHT, R. J.; NORTHUP, S. J.; THOMAS, J. A. A Review of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*. v. 4. p. 843-853. 1984.

VORLOVÁ, L.; BORKOVCOVÁ, I.; KALÁBOVÁ, K.; VEČEREK, V. Hydroxymethylfurfural contents in foodstuffs determined by HPLC method. *Journal of Food and Nutrition Research*. v. 45. n.1. p. 34-38. 2006.

WROLSTAD, R. E. Food Carbohydrate Chemistry. Inglaterra: Wiley-Blackwell, 2012.

ZAPPALÀ, M.; FALLICO, B.; ARENA, E.; VERZERA, A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*. v. 16. p. 273-277. 2005.

**CAPÍTULO 3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HMF EM ALIMENTOS**

### **3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HMF EM ALIMENTOS**

Na literatura podem ser encontrados vários métodos para determinação de HMF em alimentos e bebidas, incluindo métodos colorimétricos, espectrofotométricos, cromatográficos, polarográficos e espectroscópicos (TRUZZI et al., 2012). No entanto, nesta revisão, nos itens a seguir, serão apresentados os principais trabalhos já realizados sobre os métodos espectrofotométricos e cromatográficos para alimentos, os quais são o objeto do presente estudo.

Os métodos espectrofotométricos se baseiam na medida da absorbância do HMF na região do visível como no método modificado de Winkler (1955) e no método de Schade (1958) e na região do UV como no método modificado de White (1979) (ZAPPALÀ, et al., 2005; LEMOS et al., 2010; THEOBALD et al., 1998; SPANO et al., 2006). As técnicas cromatográficas utilizadas são baseadas na cromatografia gasosa, cromatografia líquida com detecção UV (CLAE-UV), cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (CLAE-MS) e cromatografia eletrocínética capilar micelar do inglês *Micellar electrokinetic chromatography* (MECK). Recentemente, vários métodos de CLAE têm sido desenvolvidos para a determinação de HMF com detecção na região do UV, entre 280 – 285 nm, para alimentos como mel, vinho e outras bebidas alcoólicas, sucos de frutas, frutas secas, biscoitos, vinagres, alimentos infantis e café (THEOBALD et al., 1998; GASPAR e LUCENA, 2009; LEMOS et al., 2010; SPANO et al., 2006; AMEUR et al., 2006; GÖKMEN e SENYUVA, 2006).

#### **3.1. Métodos Espectrofotométricos**

##### **3.1.1. Método Espectrofotométrico Modificado de Winkler (1955)**

O método espectrofotométrico modificado de Winkler (1955) foi desenvolvido para a determinação de HMF em mel, mas na literatura são encontrados relatos de aplicação a outros alimentos como uísque, vinhos, sucos de frutas e xarope de uva. Este se baseia na determinação de HMF em amostras de mel clarificadas com soluções de Carrez I (solução de ferrocianeto de potássio - 15% (m/v)) e de Carrez II (solução de acetato de zinco – 30% (m/v)), através da medida de sua absorbância na região do visível, no comprimento de onda

de 550 nm, após a reação com soluções de *p*-toluidina e ácido tiobarbitúrico (AMEUR et al., 2006; ZAPPALÀ et al., 2005; BOGDANOV, 1997; WINKLER, 1955).

Recentemente, a Comissão Internacional de Mel (IHC) recomendou que esta metodologia não fosse empregada para a determinação deste contaminante em mel por duas razões: primeiro por utilizar o reagente *p*-toluidina que é um composto carcinogênico que oferece riscos a saúde do analista e segundo por apresentar baixa precisão e especificidade, pois outros compostos com grupos carbonila presentes no alimento ou formados durante o processamento térmico também podem reagir com o ácido tiobarbitúrico produzindo resultados de HMF superestimados (BOGDANOV, 1997; TRUZZI et al., 2012).

### 3.1.2. Método Espectrofotométrico Modificado de White (1979)

O método espectrofotométrico modificado de White (1979) é o método oficial para a determinação de HMF em mel indicado pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) e Comissão Internacional de Mel (BOGDANOV, 1997) (SILVA et al., 2008). Este se baseia na determinação dos níveis de HMF em amostras de mel clarificadas com soluções de Carrez I e de Carrez II, através da medida de sua absorvância na região do UV, nos comprimentos de onda de 284 e 336 nm (WHITE, 1979; TEIXIDÓ et al., 2011) antes e após a reação do HMF com o íon bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ). O íon bissulfito ao ser adicionado à solução de mel clarificada impede a condensação dos açúcares redutores, aldeídos e cetonas com aminoácidos e proteínas presentes na matriz, bloqueando os grupos carbonílicos. Na determinação de HMF pelo método modificado de White, o íon  $\text{HSO}_3^-$  destrói, assim, o grupo cromóforo ( $\text{C}=\text{O}$ ) do HMF presente no mel, e liga-se à molécula deste contaminante. A reação está representada na Figura 3.1.

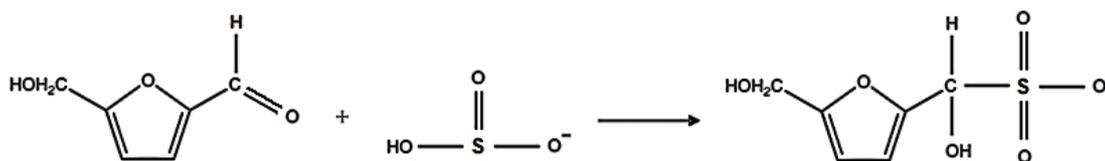
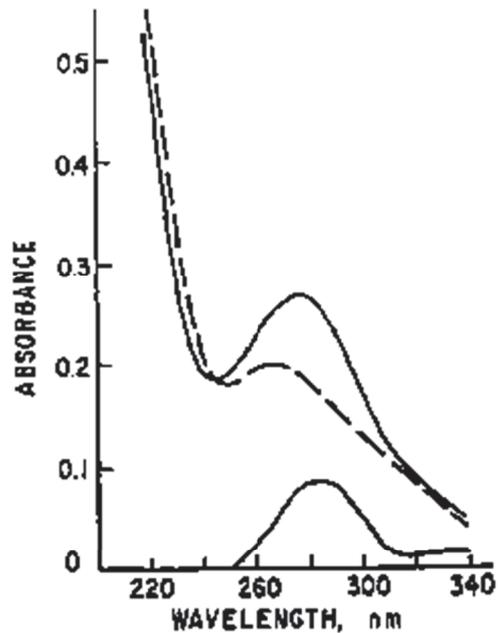


Figura 3.1. Reação do HMF com o íon bissulfito

O resultado desta reação é uma diminuição na absorvância da amostra, como pode ser verificado nos espectros de varredura na região de absorção do UV obtidos por White (1979) com e sem a adição de solução de bissulfito e representados na Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Espectro da solução aquosa de mel clarificada 2% (m/v) (—) e com adição de solução de bissulfito 0,2% (m/v) (- - -), e o espectro de diferença entre o primeiro (amostra (—)) e o segundo (referência (- - -)).

(Fonte: WHITE, 1979)

Dessa forma, é possível quantificar o HMF presente no mel, pela diferença das absorvâncias obtidas para a amostra (solução de mel clarificada) e a referência (solução de mel clarificada adicionada da solução de bissulfito). A subtração dos espectros (Figura 3.2) obtida por White (1979) mostra uma banda de absorção forte em 284 nm e uma pequena absorvância não específica entre 320-340 nm. Assim, a determinação da absorvância final resultante para o HMF, é obtida pela subtração da absorvância obtida em 336 nm, da absorvância determinada em 284 nm. Para a quantificação de HMF não se utiliza curva de calibração e os valores de concentração deste contaminante são calculados levando-se em consideração sua absorvância molar teórica de acordo com a equação 3.1.

$$HMF (mg kg^{-1}) = \frac{(Abs_{284} - Abs_{336}) \times 149,5 \times 5}{massa (g)} \quad (\text{Equação 3.1})$$

Sendo o fator 149,5 dado por:

$$149,5 = \left( \frac{126}{16830} \right) \times \left( \frac{1000}{10} \right) \times \left( \frac{1000}{m_t} \right) \quad (\text{Equação 3.2})$$

Em que:

126 = peso molecular do HMF

16830 = absorvidade molar do HMF a 284 nm

1000 = conversão de g para mg

10 = diluição de 5 g de mel para 50,0 mL

1000 = conversão de g para kg

$m_t$  = massa teórica = 5

Este método tem se mostrado rápido, exato e preciso para determinar concentrações de HMF mais elevadas ( $> 15 \text{ mg kg}^{-1}$ ) como observado em um estudo colaborativo realizado pela Comissão Internacional de Mel (IHC) em que seu desempenho foi investigado em relação a um método de CLAE-UV e o método modificado de Winkler (1955). Pequenas diferenças entre estes métodos foram observadas somente em baixas concentrações ( $< 15 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (ZAPPALÀ et al., 2005; BOGDANOV, 1997). No entanto, méis de coloração escura normalmente apresentam absorvâncias em 284 nm elevadas, tornando necessária a diluição das soluções amostra e referência antes da leitura no espectrofotômetro, o que aumenta a incerteza na determinação do HMF (MITRA, 2003). Assim, amostras que apresentam valores de absorvâncias maiores que 0,6 devem ser diluídas, pois se considera que acima deste valor de absorvância há perda de linearidade (WHITE, 1979).

### 3.2. Métodos Cromatográficos

Atualmente, os métodos mais utilizados para a determinação de HMF em alimentos são os métodos cromatográficos. Entre estes, podem ser encontrados na literatura métodos aplicando as técnicas de Cromatografia Gasosa, Eletroforese Capilar e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa com detecção UV (CLAE-UV).

O método de CLAE-UV é o mais utilizado, e se baseia na determinação de HMF por eluição isocrática ou gradiente, através da separação e/ou extração deste contaminante dos outros componentes da amostra, como aldeídos que possam estar presentes (ZAPPALÀ et al., 2005). Alguns trabalhos publicados propõem a utilização desta metodologia, com algumas adaptações: na fase móvel, nas proporções dos solventes utilizados para a extração e no tipo de coluna empregada (VORLOVÁ et al., 2006; RISNER et al., 2006; ZAPPALÀ et al., 2005; MURKOVIC e PICHLER, 2006; MAKAWI et al., 2009; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2000;

LEMOS et al., 2010; GASPAR e LUCENA, 2009). Dessa forma, não existe uma metodologia única para determinar HMF em alimentos por CLAE-UV, sendo as condições de análise adaptadas de acordo com os objetivos específicos para o estudo realizado.

Na literatura se pode observar que a maior parte das metodologias cromatográficas faz a separação do HMF de outros componentes da matriz por fase reversa empregando colunas de C18 com tamanho de partícula de 4,0 ou 5,0  $\mu\text{m}$ . (LEMOS et al., 2010; RISNER et al., 2006; DURMAZ e GÖKMEN, 2010; GASPAR e LUCENA, 2009; VORLOVÁ et al., 2006; MAKAWI et al., 2009; ZAPPALÀ et al., 2005; AMEUR et al., 2006; KALÁBOVÁ et al., 2003; SPANO et al., 2006; THEOBALD et al., 1998; TRUZZI et al., 2012; RADA-MENDOZA et al., 2002; RADA-MENDOZA et al., 2004). A coluna pode ser termostaticada e são encontrados trabalhos que fazem uso de temperaturas de 25°C até 55°C (VORLOVÁ et al., 2006; KALÁBOVÁ et al., 2012; DURMAZ e GÖKMEN, 2010; BASTOS et al., 2011; THEOBALD et al., 1998; RISNER et al., 2006).

A eluição dos diferentes componentes presentes nas amostras de alimentos incluindo o HMF é feita normalmente de forma isocrática, com fase móvel de composição e proporções variadas, com ou sem adição de modificadores (ácido, sal orgânico, entre outros). A fase móvel mais comumente adotada é de água/metanol, nas proporções, 95:5 (v/v), 90:10 (v/v), 87,5:12,5 (v/v) e 80:20 (v/v) (MURKOVIC e PICHLER, 2006; TRUZZI et al., 2012; VORLOVÁ et al., 2006; KALÁBOVÁ et al., 2012; THEOBALD et al., 1998; MAKAWI et al., 2009). Em alguns trabalhos são utilizados também ácido acético, ácido sulfúrico e acetato de sódio como modificadores (ZAPPALÀ et al., 2005; KALÁBOVÁ et al., 2012; SPANO et al., 2006; SPANO et al., 2009; AMEUR et al., 2006). Outras composições de fase móvel também podem ser encontradas como a de água/acetonitrila, nas proporções de 80:20 (v/v), 95:5 (v/v), 90:10 (v/v) (com 10 mM de ácido fórmico), 95:5 (v/v) (0,1% de ácido fórmico) ou água ultrapura (LEMOS et al., 2010; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2000; DURMAZ e GÖKMEN, 2010; BASTOS et al., 2011; RISNER et al., 2006).

A determinação de HMF por CLAE-UV pode ser realizada em uma faixa de comprimentos de onda de 280 a 285 nm (THEOBALD et al., 1998; GASPAR e LUCENA, 2009; LEMOS et al., 2010; SPANO et al., 2006; AMEUR et al., 2006; GÖKMEN e SENYUVA, 2006). Estes valores de comprimento de onda diferenciam-se devido às condições cromatográficas utilizadas, especialmente com relação à composição da fase móvel que juntamente com a velocidade de fluxo apresentam grande influência no tempo de retenção obtido para o analito (SPANO et al., 2009).

Nos métodos de CLAE-UV desenvolvidos a principal matriz analisada foi o mel. No entanto, esta técnica possibilita a análise de outros alimentos contendo carboidratos como: vinho e outras bebidas alcoólicas, sucos de frutas, frutas secas, biscoitos, vinagres, alimentos infantis, café, xarope de glicose de milho e melaço de cana (THEOBALD et al., 1998; GASPAR e LUCENA, 2009; LEMOS et al., 2010; SPANO et al., 2006; AMEUR et al., 2006; GÖKMEN e SENYUVA, 2006; MAKAWI et al., 2009; VORLOVÁ et al., 2006; RISNER et al., 2006).

O método de CLAE-UV em comparação com os métodos espectrofotométricos utilizados para determinação de HMF em alimentos é muito eficiente, apresentando alta resolução, versatilidade e sensibilidade (LEMOS et al., 2010; ZAPPALÀ et al., 2005). Embora esta metodologia seja muito utilizada para determinação de HMF em diversas matrizes, na literatura são escassos os estudos dedicados à análise cromatográfica deste contaminante em alimentos como xarope de glicose e melaço de cana (RISNER et al., 2006; VORLOVÁ et al., 2006; MAKAWI et al., 2009).

Na literatura existem diversas metodologias de CLAE-UV para determinação de HMF em amostras de mel. Truzzi et al. (2012) desenvolveram uma metodologia de CLAE-UV para determinação de HMF em mel, em que as amostras quando preparadas passavam por uma etapa de agitação durante 05 minutos, para melhor homogeneizar a amostra. De forma similar, Risner et al. (2006) utilizou uma etapa de agitação da amostra por 30 segundos, para posterior análise por CLAE-UV. No entanto, a maioria dos trabalhos desenvolvidos para mel, por CLAE-UV, não utilizam uma etapa de preparação das amostras, sendo as mesmas somente diluídas em água ultrapura e filtradas em membranas de 0,45 µm, antes da injeção no cromatógrafo (RISNER et al., 2006; ZAPPALÀ et al., 2005; SPANO et al., 2006; SPANO et al., 2009; LEMOS et al., 2010; MAKAWI et al., 2009). A fase móvel utilizada para quantificação de HMF nesta matriz, geralmente é água/metanol, com tempos de análise de 1 a 15 minutos (RISNER et al., 2006; ZAPPALÀ et al., 2005; SPANO et al., 2006; SPANO et al., 2009; LEMOS et al., 2010; MAKAWI et al., 2009). Lemos et al. (2010) utilizou como fase móvel água/acetonitrila, e obteve um tempo de análise de aproximadamente 04 minutos. É possível verificar na literatura que embora existam várias metodologias de CLAE-UV para determinação de HMF em mel, são poucos os trabalhos que apresentam estudos de validação para este contaminante nesta matriz (RISNER et al., 2006; LEMOS et al., 2010; SPANO et al., 2006; SPANO et al., 2006; TRUZZI et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, são encontrados poucos trabalhos na literatura para determinação de HMF em xarope e melado de cana pelo método de CLAE-UV. Vorlová et al. (2006) realizaram um estudo de determinação de HMF em amostras de vários alimentos, entre eles, o xarope. Para as determinações, a amostra passava por um processo de pré-tratamento, em que soluções das amostras de xarope eram preparadas juntamente com adição de soluções de Carrez I e de Carrez II. Estas soluções permaneciam em repouso durante 30 minutos e posteriormente realizava-se a filtração do sobrenadante por um filtro de membrana de 0,45 µm para, em seguida, realizar a análise no cromatógrafo. Para a eluição utilizava-se como fase móvel água/metanol (90:10 (v/v)).

Em estudos para melado de cana, Risner et al. (2006) realizou a determinação de HMF a partir de um método validado para mel, em que a análise das amostras de melado (molasses) era realizada sem uma etapa de tratamento. As soluções eram preparadas, agitadas durante 30 segundos, posteriormente realizava-se a filtração em membranas de 0,45 µm, e era realizada a análise por CLAE-UV. Em um estudo realizado por Toker et al. (2013), a determinação de HMF em amostras de melado de frutas (uva, amora, amora preta e alfarroba) era realizada com pré-tratamento das amostras. Soluções das amostras de melado eram preparadas, nas quais eram adicionados 1,5 mL de solução de Carrez I e de Carrez II. As amostras eram centrifugadas por 15 minutos, sendo em seguida o sobrenadante filtrado em filtro de 0,22 µm, para posterior injeção no cromatógrafo. A fase móvel utilizada consistia de água (ácido acético 1,0%)/acetonitrila (95:5 (v/v)).

Visto estes fatores, observa-se a necessidade do desenvolvimento e validação de metodologias de CLAE-UV para determinação de HMF em amostras de mel, xarope e melado de cana, que sejam rápidas, permitam uma análise sem necessidade de preparação da amostra e que proporcionem resultados confiáveis, com precisão e exatidão adequadas.

### **3.3. Aspectos Gerais sobre Validação de Métodos**

Nos últimos tempos, a preocupação com a segurança alimentar intensificou-se, levando ao desenvolvimento de métodos analíticos para determinação e quantificação de substâncias e/ou compostos químicos que possam estar presentes em matrizes alimentares, como uma forma de controle de qualidade e para garantir a segurança alimentar. As técnicas de separação (a exemplo da CLAE e CG) ganham destaque, devido à capacidade de realizar análises quantitativas e qualitativas em amostras alimentares, bem como ambientais,

farmacêuticas e biológicas (RIBANI et al., 2004). No entanto, os métodos analíticos desenvolvidos devem originar resultados que sejam confiáveis. Para tanto, torna-se necessário avaliar o método proposto, sua eficiência, bem como sua precisão e exatidão, para que este possa ser aplicado como método de análise de rotina em um laboratório (RIBEIRO et al., 2008). Dessa forma, um estudo de validação de método deve ser realizado, o qual é um processo que define as exigências analíticas, para confirmar se o método proposto apresenta bom desempenho para determinada finalidade e para garantir a confiabilidade dos resultados (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008).

O estudo de validação pode ser realizado de forma intralaboratorial (*in house validation*), em que as etapas de validação são realizadas em um único laboratório, ou de forma completa (*full validation*) em que se realiza um estudo interlaboratorial para avaliar o comportamento da metodologia com uma matriz específica em laboratórios diferentes (RIBANI et al., 2004).

A validação de métodos é realizada por meio de figuras de mérito ou parâmetros de validação, que são os indicadores do bom desenvolvimento e confiabilidade da metodologia. Para um estudo de validação são determinados normalmente os parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade), exatidão e robustez (RIBEIRO et al., 2008; ARAUJO, 2009).

A seletividade permite verificar se o método é seletivo para quantificar o analito de interesse na presença de outras substâncias que podem interferir na análise em uma amostra complexa (ARAUJO, 2009; RIBANI et al., 2004). Este parâmetro é o primeiro passo a ser avaliado na validação de um método que está sendo desenvolvido, devendo-se para tanto, este parâmetro estar sendo analisado de forma contínua durante a validação (RIBANI et al., 2004). A seletividade pode ser avaliada pela comparação da matriz sem a substância de interesse e a matriz contendo esta substância (adição de uma quantidade de padrão). Assim nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância que está sendo analisada. Esta avaliação pode ocorrer ainda, pela utilização de detectores modernos, como arranjo de diodos e espectrômetro de massas, em que há a comparação do pico obtido na separação dos componentes de uma amostra com o do padrão, indicando assim, a presença do composto puro (RIBANI et al., 2004).

O estudo de linearidade permite determinar a faixa na qual o sinal analítico é linearmente proporcional à concentração do analito de interesse, sendo esta análise realizada

por meio de curva de calibração ou curva analítica (RIBEIRO et al., 2008; SOUZA, 2007). As curvas de calibração podem ser construídas pelo método de padronização externa, adição de padrão e padronização interna (RIBANI et al., 2004). Para analisar a linearidade do método, realiza-se uma regressão linear baseada nos mínimos quadrados, por meio da qual se obtém o  $F_{regressão}$  e  $F_{falta\ de\ ajuste}$ . Inicialmente, realiza-se um teste de falta de ajuste do modelo, em que o resultado deve apresentar  $F_{falta\ de\ ajuste} < F_{crítico}$  ( $p > 0,05$ ), de modo a verificar se o modelo linear gerado é adequado. Posteriormente, o método linear é avaliado ainda pelo  $F_{regressão}$ , em que o resultado deve apresentar  $F_{regressão} > F_{crítico}$  ( $p < 0,05$ ). Assim, nesta condição o modelo linear é considerado aceitável. Os resíduos devem ser considerados, sendo que os mesmos devem estar distribuídos homogeneamente. Estas análises confirmam se o método apresenta linearidade adequada, e o modelo não apresenta falta de ajuste (FEINBERG E RAGUÈNÈS, 1999). Na literatura, muitos pesquisadores consideram ainda o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) como uma forma de avaliar a linearidade. Segundo a Anvisa (2003) este deve ser  $> 0,99$ . No entanto, o mesmo não confirma se o método é linear.

A sensibilidade do método pode ser avaliada por meio dos limites de detecção e de quantificação. O limite de detecção (LD) é a menor concentração de analito que pode ser detectada pela técnica instrumental e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão do método (RIBEIRO et al., 2008).

Outro importante parâmetro a ser avaliado em um estudo de validação é a precisão. Este parâmetro fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio. A precisão é estimada, através do desvio padrão relativo do inglês *relative standard deviation* (RSD) ou coeficiente de variação (CV) e pode ser avaliada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (RIBEIRO et al., 2008; ARAUJO, 2009; SOUZA, 2007). A repetitividade permite verificar se os resultados obtidos para as análises de uma amostra são concordantes, utilizando as mesmas condições de análise, mesmo analista, instrumento e laboratório e no mesmo dia (RIBANI et al., 2004). A precisão intermediária é uma estimativa da precisão do método dentro de um mesmo laboratório (intralaboratorial), utilizando as mesmas condições, mas com analistas, equipamentos e/ou dias diferentes, ou combinação dos três fatores (RIBEIRO et al., 2008; RIBANI et al., 2004). A reprodutibilidade é a precisão realizada para uma mesma amostra, em laboratórios diferentes, com as mesmas condições de análise (RIBEIRO et al., 2008; RIBANI et al., 2004). Por meio deste estudo de reprodutibilidade (interlaboratorial) permite-se uma padronização do procedimento analítico

avaliado (RIBANI et al., 2004). Os resultados obtidos para repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade podem ser comparados com um método já existente. No entanto, quando não existem métodos para comparação, os parâmetros obtidos para a precisão podem ser avaliados pelo valor Horrat. Este valor permite estimar os desvios padrão relativos (RSDs) teóricos para repetitividade e reprodutibilidade (INMETRO, 2011; TAVERNIERS et al., 2004). Para o cálculo do valor Horrat, é necessário o  $RSD_{ri}$  que é o desvio padrão relativo para análises em dias diferentes e o desvio padrão relativo predito do inglês *predicted relative standard deviation* ( $PRSD_R$  %). O  $PRSD_R$  % depende da concentração do analito, sendo dado pela Equação 3.2 e o valor Horrat pela Equação 3.3 (JAIN e ARNOLD, 2007):

$$PRSD_R \% = 2 C^{-0,15} \quad (\text{Equação 3.2})$$

$$Horrat = \frac{RSD_{ri}}{PRSD_R} \quad (\text{Equação 3.3})$$

A reprodutibilidade é considerada satisfatória, se os mesmos apresentarem valores de Horrat menores que 2,0 (INMETRO, 2011).

A exatidão de um método permite verificar se os resultados individuais obtidos para uma amostra apresentam concordância com um valor de referência considerado como verdadeiro (RIBEIRO et al., 2008). A exatidão de um método pode ser avaliada pelo uso de materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (RIBANI et al., 2004).

A robustez mede a suscetibilidade do método, diante de pequenas variações dos parâmetros analíticos que podem ocorrer durante a análise, sem alterar significativamente sua exatidão e precisão, dessa forma, é uma medida da quantidade de variabilidade que o método suporta, de modo a manter sua confiabilidade (LEMOS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2008).

Os parâmetros utilizados para a validação de um método diferem dependendo da finalidade do mesmo, bem como a técnica analítica empregada ou protocolo de validação a ser seguido (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008).

Na literatura são encontrados alguns estudos de validação do método de CLAE-UV para determinação de HMF em mel. Risner et al. (2006) realizou a validação de um método de CLAE-UV para determinação de HMF em mel e outros alimentos contendo altos teores de açúcares. Os parâmetros avaliados foram precisão (no mesmo dia e em dias diferentes), linearidade, limite de detecção e recuperação para análise de exatidão. Outros métodos

validados, não realizaram estudos de robustez e seletividade (SPANO et al., 2006; SPANO et al., 2009; TRUZZI et al, 2012). Lemos et al. (2010) realizou um estudo de validação para mel, considerando todos os parâmetros de validação: seletividade (pela comparação dos tempos de retenção do padrão de HMF e da amostra), linearidade (por padronização externa), LD e LQ, exatidão (ensaios de recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e robustez (pela aplicação de planejamento fatorial).

Não foi encontrado na literatura um estudo de validação por CLAE-UV para determinação de HMF em amostras de xarope e melaço de cana. Risner et al. (2006) realizaram a validação deste contaminante em mel e aplicaram a metodologia validada para xarope de bordo e melaço (molasses).

### 3.4. Referências

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

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em: maio, 2013.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and evaluation. *Journal of Chromatography B*. v. 877. p. 2224-2234. 2009.

BASTOS, D. H. M.; SHIBAO, J.; FERREIRA, E. L.; BOMBO, A. J. Produtos da reação de Maillard em alimentos. *Soc. Bras. Alim. Nutr.* v. 36. p. 63-78. 2011.

BOGDANOV, S. Harmonised Methods of the International Honey Commission. *Apidologie, Sp. Iss.* p. 1-59. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação de produtos apícolas e derivados. Instrução Normativa n.11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de Identidade de Qualidade do Mel. 2000.

DURMAZ, G.; GÖKMEN, V. Determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural and 2-furfural in oils as indicators of heat pre-treatment. *Food Chemistry*. v. 123. p. 912-916. 2010.

FEINBERG, M; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. *Analytica Chimica Acta*. v. 391. p. 239-252. 1999.

GASPAR, E. M. S. M.; LUCENA, A. F. F.; Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry*. v. 114. p. 1576–1582. 2009.

GÖKMEN, V.; SENYUVA, H.Z. Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 54., n. 8, p. 2845-2849. 2006.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE008 – Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 04, julho/2011.

JAIN, A. V.; ARNOLD, B. Basic concepts of analytical toxicology. Editado por Ramesh C. Gupta. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. New York: Elsevier, 2007.

KALÁBOVÁ, K.; VORLOVÁ, L.; BORKOVCOVÁ, I.; SMUTNÁ, M.; VEČEREK, V. Hydroxymethylfurfural in Czech honeys. *Czech J. Anim. Sci.* v. 48. p. 551-557. 2003.

LEMOS, G. da S.; SANTOS, J. S. dos; SANTOS, M. L. P. dos; Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. *Química Nova*. v. 33. n. 8. p. 1682-1685. 2010.

MAKAWI, S. Z. A.; TAHA, M. I.; ZAKARIA, B. A.; SIDDIG, B.; MAHMUD, H.; ELHUSSEIN, A. R. M.; KARIEM, E. A. G.; Identificatiois and quantification of 5-Hydroxymethyl Furfural HMF in some sugar-containing food products by HPLC. *Pakistan Journal Nutrition*. v. 8. n. 9. p. 1391-1396. 2009.

MITRA, S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003. v. 162.

MURKOVIC, M.; PICHLER, N. Analysis of 5-hydroxymethylfurfual in coffee, dried fruits and urine. *Mol. Nutr. Food Research*. v. 50. p. 842-846. 2006.

RADA-MENDOZA, M.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chemistry*. v. 79. p. 513–516. 2002.

RADA-MENDOZA, M.; SANZ, M. L.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. *Food Chemistry*. v. 85. p. 605-609. 2004.

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

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. v. 27. p. 771-780. 2004.

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. da; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*. v. 31. p. 164-171. 2008.

RISNER, C. H.; KISER, M. J.; DUBE, M. F. An Aqueous High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey and Other Sugar-containing Materials. *Journal of Food Science*. v. 71. n. 3. p. 179-184. 2006.

SCHADE, J. E.; MARSH, G. L.; ECKERT, J. E. Diastase activity and hidroxyl-methylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat alteration. *Food Research*. v.23. p. 446-463. 1958.

SILVA, S. J. N. da; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEIN, M. H.; JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 28. p. 46-50. 2008.

SOUZA, S. V. C. de. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. 2007. 297f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SPANO, N.; CASULA, L.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SCANU, R.; TAPPARO, A.; SANNA, G. An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey: The case of strawberry tree honey. *Talanta*. v. 68. p. 1390-1395, 2006.

SPANO, N.; CIULU, M.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SALIS, S.; SANNA, G. A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey. *Talanta*. v. 78. p. 310-314, 2009.

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

TEIXIDÓ, E.; NÚÑEZ, O.; SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry* v. 126. p. 1902–1908. 2011.

THEOBALD, A.; MULLER, A.; ANKLAM, E. Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Vinegar Samples by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* v. 46. p. 1850-1854. 1998.

TOKER, O. S.; DOGAN, M.; ERSÖZ, N. B.; YILMAZ, M. T. Optimization of the content of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) formed in some molasses types: HPLC-DAD analysis to determine effect of different storage time and temperature levels. *Industrial Crops and Products*. v. 50. p. 137-144. 2013.

TRUZZI, C.; ANNIBALDI, A.; ILLUMINATI, S.; FINALE, C.; ROSSETTI, M.; SCARPONI, G. Determination of Very Low Levels of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) in Natural Honey: Comparison Between the HPLC Technique and the Spectrophotometric White Method. *Journal of Food Science*. v. 77. p. 784-790. 2012.

VORLOVÁ, L.; BORKOVCOVÁ, I.; KALÁBOVÁ, K.; VEČEREK, V. Hydroxymethylfurfural contents in foodstuffs determined by HPLC method. *Journal of Food and Nutrition Research*. v. 45. n.1. p. 34-38. 2006.

WHITE, J. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. v.62. p.509-514. 1979.

WINKLER, O. Beitrag zur Nachwals und zur Bestimmung von Oxymethylfurfural in Honig und Kunsthonig. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forshung*. n.3. v. 102. p. 161-167. 1955.

ZAPPALÀ, M.; FALLICO, B.; ARENA, E.; VERZERA, A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*. v. 16. p. 273-277. 2005.

## **CAPÍTULO 4. AMOSTRAGEM**

#### 4. AMOSTRAGEM

Neste capítulo serão descritas informações a cerca das amostras de mel, de xarope e de melaço de cana utilizadas no estudo, incluindo a codificação adotada no laboratório, procedência, data de fabricação e/ou de validade, aspecto visual bem como informações sobre o processamento térmico das mesmas (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1.** Informações e codificação das amostras de mel, xarope e melaço de cana.

ID <sup>1</sup>	Procedência	Data de Fabricação/ Data de Validade <sup>2</sup>	Tipo de Processo <sup>3</sup>	Aspecto Visual
M1	Prudentópolis/PR	Jan/2013 <sup>a</sup>	Artesanal <sup>c</sup>	Âmbar claro
M2	Guarapuava/PR	Abr/2013 <sup>a</sup>	Artesanal <sup>d</sup>	Âmbar claro
M3	Pitanga/PR	Jul/2012 <sup>a</sup>	Industrial	Âmbar escuro
M4	Vale do Ribeira-Iporanga/SP	Abr/2011 <sup>a</sup>	Artesanal	Âmbar claro
M5	Canadá	Não informado	Industrial <sup>e</sup>	Âmbar claro
M6	Canadá	Não informado	Industrial <sup>e</sup>	Âmbar claro
M7	Canadá	Abr/2013 <sup>a</sup>	Industrial	Âmbar claro
M8	Canadá	Abr/2013 <sup>a</sup>	Industrial	Âmbar claro
M9	Canadá	Não informado	Industrial <sup>e</sup>	Âmbar claro
X1	Paranavaí/PR	Set/2011 <sup>b</sup>	Industrial	Âmbar claro
X2	Caranhus/PE	Nov/2013 <sup>b</sup>	Industrial	Âmbar claro
X3	Pato Branco/PR	Dez/2011 <sup>a</sup>	Industrial	Âmbar claro
X4	Estados Unidos	Dez/2015 <sup>b</sup>	Industrial	Âmbar claro
X5	St. Honoré/Canadá	Out/2015 <sup>b</sup>	Industrial	Âmbar claro
X6	Paranavaí/PR	Jun/2014 <sup>b</sup>	Industrial	Âmbar claro
X7	Caranhus/PE	Mai/2014 <sup>b</sup>	Industrial	Âmbar claro
X8	Pato Branco/PR	Dez/2011 <sup>a</sup>	Industrial	Âmbar claro
MC1	Espigão Azul-Cascavel/PR	Mai/2012 <sup>a</sup>	Artesanal	Âmbar médio
MC2	2º Distrito Santo Antônio da Patrulha/RS	Jun/2013 <sup>b</sup>	Artesanal <sup>d</sup>	Âmbar escuro
MC3	Jaraguá do Sul/SC	Mai/2013 <sup>b</sup>	Industrial	Âmbar escuro
MC4	2º Distrito Santo Antônio da Patrulha/RS	Dez/2013 <sup>b</sup>	Industrial	Âmbar escuro
MC5	Luís alves/SC	Abr/2013 <sup>a</sup>	Industrial	Âmbar claro
MC6	Canadá	Set/2014 <sup>b</sup>	Industrial	Âmbar escuro
MC7	Espigão Azul-Cascavel/PR	Jul/2013 <sup>a</sup>	Artesanal	Âmbar médio

<sup>1</sup> ID = Identificação das amostras em que as letras correspondem a identificação do alimento (M = mel; X = xarope ; MC = melaço de cana) e os números as amostras; <sup>2,a</sup> data de fabricação; <sup>2,b</sup> data de validade; <sup>3,c</sup> Produtor rural, <sup>3,d</sup> Cooperativa, <sup>3,e</sup> Com aplicação de pasteurização.

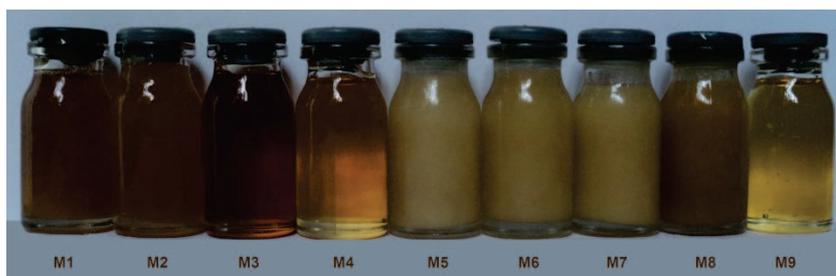
As amostras de mel, de melaço de cana e de xarope foram obtidas ao acaso de estabelecimentos comerciais ou diretamente de apicultores e cooperativas localizados em Guarapuava – PR, Brasil e em Winnipeg, Canadá no período de 2012 a 2013. As amostras ao

serem recebidas no laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação (LabGati) da Unicentro foram identificadas por uma codificação que consistia de uma letra identificando o tipo de alimento (M = mel, X = xarope e MC = melaço de cana) e um número de ordem de chegada.

#### 4.1. Amostras de Mel

O mel é um produto alimentício, uma substância açucarada produzida pelas abelhas do gênero *Apis mellifera*, podendo ser obtido a partir do néctar das flores e das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas. Esse material é recolhido pelas abelhas, as quais os transformam, combinando com substâncias específicas próprias, depois depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer em favos da colmeia (CE, 2002; ANDRADE et al., 2013).

Para o estudo foram adquiridas nove amostras de mel e destas as amostras M1 a M4 e M9 ao serem recebidas no laboratório estavam no estado líquido enquanto que as amostras M5 a M8 encontravam-se cristalizadas (Figura 4.1). Entre as amostras de mel foram observadas também colorações bem diferenciadas variando do âmbar claro ao âmbar escuro. As amostras oriundas do Canadá, M5, M6 e M9 além do processamento normalmente aplicado foram também pasteurizadas. As amostras M7 e M8 também provenientes do Canadá, diferentemente das demais amostras foram acondicionadas em tanques de aço inoxidável aquecido para evitar sua cristalização e comercializadas a granel. Como observado na Tabela 4.1 o processamento do mel foi classificado neste trabalho como artesanal quando realizado por pequenos apicultores em sua própria propriedade ou cooperativas e industrial quando realizado por entrepostos.



**Figura 4.1.** Fotos das amostras de mel provenientes do Brasil e do Canadá.

O processamento do mel inicia-se com a retirada das melgueiras (favos de mel), que são levadas para as unidades de extração, onde passam por uma limpeza externa. Em seguida é realizada a desoperculação que consiste na retirada da cera que isola os opérculos dos favos. Ocorre então a centrifugação para retirada do mel dos favos e em seguida a filtração para retirar fragmentos de cera e de abelhas que são produzidos durante o processo de centrifugação. Posteriormente, realiza-se a decantação para separação das pequenas bolhas e sujidades ainda presentes. Em seguida o mel é envasado para comercialização, sendo armazenado em lugar seco, arejado e ao abrigo de luz. Em entrepostos e cooperativas, antes da etapa de filtração, pode ser realizada ainda uma descristalização do produto para facilitar o seu fluxo entre as várias unidades do processo. O mel é então colocado no tanque de recepção que é aquecido a 40°C, para prevenir a cristalização do mesmo e posteriormente passa pelas etapas do processamento já descritas acima (SEBRAE, 2009).

Alguns méis passam por um processo de pasteurização, de modo a eliminar a maioria dos microrganismos patogênicos presentes, bem como adiar a cristalização do mesmo. Para este processo são utilizadas temperaturas superiores a 38°C, o que pode favorecer a destruição de substâncias orgânicas importantes, além de aumentar os níveis de HMF e por assim, escurecer o produto final. Este processo geralmente ocorre pelo uso de fontes de calor de alta temperatura (a exemplo as chamas abertas), ou banho-maria. No caso, o banho-maria é utilizado quando a quantidade de mel é pequena, sendo o mesmo colocado em frascos de vidro definitivos e aquecidos a 72°C por 15 a 60 segundos. No entanto, este procedimento apresenta dificuldades em manter um aquecimento uniforme em todo o mel, podendo levar ao superaquecimento local (SILVA, 2006).

#### **4.2. Amostras de Xarope**

Os xaropes são soluções compostas de açúcares, sendo geralmente a maior parte destes, açúcares redutores, podendo conter ainda misturas destes açúcares. Os xaropes apresentam concentração de açúcar entre 70% e 80% (ADITIVOS e INGREDIENTES, 2008). Este produto apresenta uma grande aplicação na indústria alimentícia, como na fabricação de biscoitos, balas, gomas de mascar, produção de bebidas alcoólicas e refrigerantes, e indústrias de panificação. Além disso, é utilizado também como umectante, prevenindo a perda de água dos alimentos, como conservante e no processamento de frutas (ADITIVOS e INGREDIENTES, 2008; BELITZ et al., 2009).

Para o xarope foram adquiridas sete amostras de xarope de glicose (X1 a X4, X6 a X8) e mais uma amostra de xarope de bordo (X5). As amostras de xarope X3 e X8 foram produzidas pelo fabricante A, as amostras X1 e X6 pelo fabricante B e as amostras X2 e X7 pelo fabricante C. O xarope de bordo é conhecido como *maple syrup* e *sirop d'érable* nos Estados Unidos e Canadá, respectivamente, e extraído da seiva bruta de árvores do gênero *Acer*, sobretudo *Acer nigrum* e *Acer saccharum*, cujo nome comum, no Brasil, é bordo (ADITIVOS e INGREDIENTES, 2008). As oito amostras de xarope adquiridas (X1 a X8) se encontravam todas líquidas, límpidas, viscosas e com colorações semelhantes, observando-se que as amostras X3 a X5 e X8 foram as únicas que apresentaram coloração mais escura que as demais (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Fotos das amostras de xarope provenientes do Brasil e do Canadá.

A literatura reporta que o xarope de glicose de milho ou xarope de açúcar invertido pode ser obtido por dois processos distintos: derivado da sacarose pelo refinamento do açúcar ou inversão completa ou parcial, ou proveniente do amido de milho (NEWTON, 2007). O xarope de glicose, oriundo do milho, pode ser obtido por hidrólise, a partir do tratamento com ácidos, temperatura e pressão, ou ainda por via enzimática (PINTO, 2009; NEWTON, 2007). O processo enzimático é o mais utilizado na fabricação do xarope de glicose de milho (RUIZ-MATUTE et al., 2010).

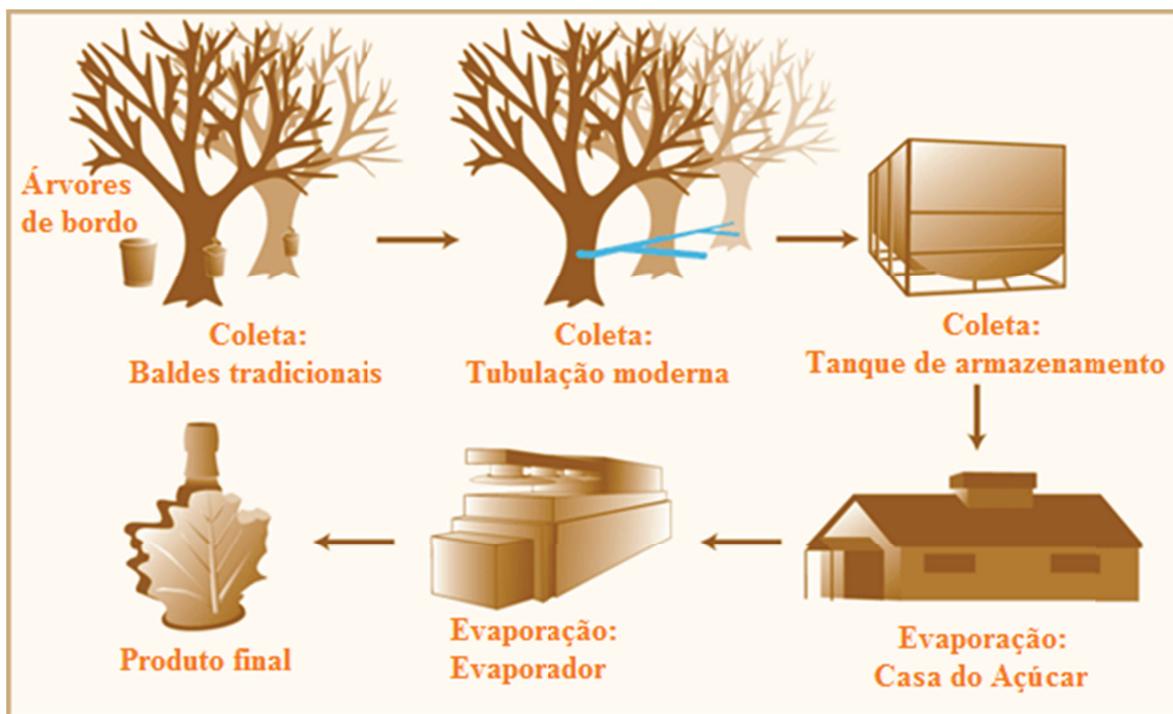
O processo de hidrólise ácida para sacarificação do amido é realizado utilizando-se ácido clorídrico ou ácido sulfúrico. O processo de transformação do amido em moléculas de glicose (dextrose), não é completo, pois não ocorre a formação de 100% de glicose. Diante disso, é possível obter dois tipos comerciais de xaropes que se diferenciam no teor de açúcares redutores medidos como equivalentes de dextrose (DE). Assim, podem ser encontrados xaropes com equivalência média de dextrose (42 DE) e equivalência alta de dextrose (65 DE) (CAUVAIN E YOUNG, 2000). Pode-se salientar ainda que o xarope de glicose 42 DE, apresenta uma faixa de pH um pouco mais elevada (5,0 – 5,5), maiores valores

de umidade bem como a presença de maiores teores de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) (250 – 400 ppm) do que o xarope com 65 DE (pH = 4,7 – 5,3; SO<sub>2</sub> = 20 – 40 ppm). O SO<sub>2</sub> origina-se no processo de obtenção do amido a partir do milho e previne a formação de coloração no xarope durante a estocagem em altas temperaturas, pois reage com o HMF formando ácidos hidróxilquilsulfônicos (PINTO, 2009; AZEVÊDO et al., 2007).

Primeiramente, o leite de amido é tratado com ácido clorídrico ou sulfúrico, para dar início à hidrólise ácida do amido. Em seguida, inicia-se a etapa de sacarificação, com aplicação de alta temperatura (160°C) e pressão. Então, o resíduo obtido é neutralizado e passa por etapas de purificação, em que os pigmentos são eliminados, utilizando-se carvão ativado e os minerais são retirados com trocadores de íons. Inicia-se assim, a etapa de evaporação à vácuo do suco purificado, até a obtenção de um teor de sólidos de 70 a 85% (m/m). Nesta etapa de hidrólise ácida vários produtos podem ser formados, entre eles o HMF (BELITZ et al., 2009).

O processo enzimático para obtenção de xarope de glicose inicia-se pela etapa de conversão parcial do amido pelo ácido, originando dextrose, sendo em seguida tratada com enzima apropriada, geralmente a enzima  $\alpha$  – amilase para assim, completar a conversão. A temperatura do processo situa-se entre 70-90°C. Algumas enzimas empregadas suportam temperaturas de até 110°C. Após a etapa de conversão, o xarope passa pela filtração, descoloração, é concentrado e posteriormente, purificado pelo uso de resinas de troca iônica. Assim, torna-se possível obter xaropes com viscosidade e doçuras diferenciadas (ADITIVOS e INGREDIENTES, 2008; BELITZ et al., 2009; STECKELBERG, 1996).

O xarope de bordo é um adoçante natural puro sendo o único adoçante natural líquido depois do mel. Este xarope é caracterizado por uma abundância de minerais traço que são essenciais para uma boa nutrição: potássio, magnésio, fósforo, manganês, ferro, zinco, cobre e estanho, bem como de cálcio em concentrações 15 vezes maior do que o mel. Ele contém apenas um décimo da quantidade de sódio que o mel apresenta, uma consideração importante para pessoas que necessitam de uma dieta com restrição de sal. O xarope de bordo é graduado de acordo com a cor, sabor e densidade; normas previstas nas legislações dos EUA e Canadá. Ele deve apresentar 66-67 ° Brix para ser classificado e vendido como xarope de bordo puro (WERNER, 2006). Seu processo de produção é ilustrado na Figura 4.3.



**Figura 4.3.** Ilustração do processo de obtenção do xarope de bordo. (Fonte: WERNER, 2006)

O processo de obtenção do xarope de bordo inicia-se com a coleta da seiva, em que são feitos talhos nos troncos das árvores e enxertados tubos, pelos quais a seiva escorre para dentro de baldes ou recipientes plásticos. A seiva coletada nos baldes é armazenada em grandes tanques, de onde é bombeada ou levada com caminhões tanque até a Casa do Açúcar. Se for usado encanamento plástico, ele é montado de tal forma que a seiva escorra, pela gravidade, diretamente até os tanques de estocagem na Casa do Açúcar. São necessários aproximadamente 40,0 litros de seiva para fabricar um litro de xarope. Na Casa do Açúcar a seiva é disposta em tanques de evaporação, onde no processo de cozimento, a água evapora e o xarope fica cada vez mais denso. Níveis intermediários de cozimento podem ser usados para obter outros produtos, como creme e manteiga de bordo (TORNQUIST, 2014).

### 4.3. Amostras de Melaço de Cana

O melaço de cana, segundo a Resolução n.12 de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde é definido como um “líquido” xaroposo, obtido a partir da evaporação do caldo de cana de açúcar ou a partir da rapadura por processos tecnológicos adequados (ANVISA, 1978). O melaço apresenta um aspecto líquido xaroposo e denso (viscoso), de coloração marrom-escura, e em sua composição encontra-se sacarose e todos os produtos originais do caldo de cana, além dos

formados durante o processamento. O melaço de cana apresenta em torno de 75,0% (m/m) de matéria seca e 50,0% (m/m) de açúcares, além de ser uma fonte rica de hidratos de carbono e sais minerais (PINTO et al., 2003). Este produto pode apresentar um máximo de 25,0% (m/m) de umidade, 10,0% (m/v) de acidez em solução e 6,0% (m/m) de resíduo mineral fixo (cinzas), além de um mínimo de 50,0% (m/m) de glicídios totais.

Para o estudo foram adquiridas sete amostras de melaço de cana (MC1 a MC7) as quais se apresentavam todas no estado líquido e denso, com material em suspensão e coloração mais escura (Figura 4.4) que a observada para as amostras de mel e de xarope (Figuras 4.1 e 4.2). A amostra MC2 oriunda do Brasil foi a que apresentou coloração mais clara e a amostra MC6 proveniente do Canadá a coloração mais escura em relação às demais amostras de melaço de cana (Figura 4.4). As amostras MC1 e MC7 foram obtidas do mesmo produtor enquanto que as demais de fabricantes diferentes.



**Figura 4.4.** Fotos das amostras de melaço de cana provenientes do Brasil e do Canadá.

O processo de produção de melaço de cana envolve várias etapas. Inicialmente, obtém-se a matéria-prima (cana-de-açúcar), sendo mais ideal a cana que contenha maior teor de açúcar (sacarose). Após, há o processo de moagem da cana para obtenção do caldo de cana. Este caldo contém cerca de 80,0% (m/m) de água e 20,0 % (m/m) de matéria sólida. O caldo passa por etapas de purificação, por meio da filtração e decantação, sendo na primeira etapa a retirada de bagacilhos de cana e posteriormente, a purificação química e térmica, para retirada de componentes que floculam, por reação ou aplicação de calor. Essas etapas garantem a obtenção de um caldo de cana mais limpo, visando a atendimento das exigências de qualidade. Em seguida, realiza-se a etapa de concentração do caldo de cana para produção do melaço, por meio da fervura do mesmo. O caldo após a ebulição é mantido à temperatura entre 103°C a 105°C, para atingir o ponto de concentração desejada. Realiza-se então, a correção da acidez do melaço com leite de cal. Por fim, o melaço é transferido para tanques de

inox, onde é resfriado a temperatura de 85°C, e posteriormente envasado para comercialização (CARVALHO, 2007).

#### 4.4. Referências

ADITIVOS e INGREDIENTES. Açúcares e xaropes em biscoitos e bolachas. São Paulo: Insumos, 2008. n. 55. p. 46-64. Disponível em: [http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/83.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/83.pdf).

ANDRADE, C. K.; ANJOS, V. E.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R.; QUINÁIA, S. P. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*. v. 146. p. 166-173. 2013.

ANVISA. CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Normas Técnicas Especiais. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Resolução n.12 de 1978. Acessado em: dezembro, 2013.

AZEVEDO, L.C.; REIS, M.M.; SILVA, L. A. da; ANDRADE, J.B. de. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Química Nova*. v. 30. n. 8. p. 1968-1975. 2007.

BELITZ, H.-D.; GROSCHE, W.; SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. 4 ed. Lichtenbergstraße: Springer, 2009.

CARVALHO, R. F. Beneficiamento dos derivados da cana de açúcar (melado e açúcar mascavo). 2007. 21f. (Dossiê Técnico) – Rede de Tecnologia da Bahia-RETEC/BA, Bahia.

CAUVAIN, S.; YOUNG, L. *Bakery Food Manufacture e Quality: Water Control and Effects*. Oxford: Blackwell Science, 2000.

CE-Comunidade Européia. Directiva 2001/110/CE de 20 de dezembro de 2001. *Jornal Oficial das Comunidades Européias*. 2002.

NEWTON, D. E. *The New Chemistry: Food Chemistry*. New York: Facts on File Science Library. 2007.

PINTO, A. P.; PEREIRA, E. S.; MIZUBUTI, I. Y. Características nutricionais e formas de utilização da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. *Ciências Agrárias*. v. 24. p. 73-84. 2003.

PINTO, M. P. Optimização dos processos de produção de xaropes de glucose e dextrose monohidratada. 2009. 40f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

RUIZ-MATUTE, A. I.; WEISS, M.; SAMMATARO, D.; FINELY, J.; SANZ, M. L. Carbohydrate Composition of High-Fructose Corn Syrups (HFCS) Used for Bee Feeding: Effect on Honey Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 58. p. 7317–7322. 2010.

SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Manual de Segurança e Qualidade para Apicultura – Série Qualidade e Segurança do Alimentos. 86p. Brasília: 2009. Disponível em: [http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/producao/familias-de-abelhas/manual\\_de\\_seguranca\\_apis.pdf](http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/producao/familias-de-abelhas/manual_de_seguranca_apis.pdf).

SILVA, E. V. C. da. Caracterização e pasteurização de méis de abelhas *Melipona fasciculata* (Uruçu Cinzenta) e *Apis mellifera* (Africanizadas). 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Pará, Belém.

STECKELBERG, C. Utilização de reator de mistura com enzima livre para obtenção de xaropes de açúcar invertido. 1996. 94f. Tese (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Desenvolvimento de Processos Químicos) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas.

TORNQUIST, B. A. NATUREZA – Maple Syrup, o xarope de árvore. Disponível em: [http://www.novolhar.com.br/noticia\\_edicoes.php?id=5301](http://www.novolhar.com.br/noticia_edicoes.php?id=5301). Acessado em: janeiro, 2014.

WERNER, L. H. (2006) Maple Sugar Industry. Disponível em: <http://www.thecanadianencyclopedia.com/en/article/maple-sugar-industry/>. Acessado em: janeiro, 2014.

**CAPÍTULO 5. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DO MÉTODO DE CLAE-UV  
PARA DETERMINAÇÃO DE HMF EM MEL, XAROPE E MELAÇO DE CANA**

## **5. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DO MÉTODO DE CLAE-UV PARA DETERMINAÇÃO DE HMF EM MEL, XAROPE E MELAÇO DE CANA**

Recentemente, vários pesquisadores tem demonstrado interesse no desenvolvimento de novos métodos analíticos para a determinação de HMF em diferentes matrizes alimentares devido a crescente preocupação da comunidade científica sobre a potencial toxicidade deste contaminante e à sua utilização no controle de qualidade dos alimentos (CAPUANO e FOGLIANO, 2011).

Entre as metodologias analíticas utilizadas para a determinação de HMF em alimentos destaca-se a CLAE-UV com eluição em fase reversa. Sendo assim, na literatura, podem ser encontrados vários trabalhos usando esta técnica para a determinação de HMF em mel, sucos de frutas, frutas secas, biscoitos, vinagres, alimentos infantis, café e vinho (GASPAR e LUCENA, 2009; LEMOS et al., 2010; SPANO et al., 2006; AMEUR et al., 2006; GÖKMEN e SENYUVA, 2006). No entanto, são escassos os estudos que se referem ao desenvolvimento de métodos de CLAE-UV para a determinação de HMF em amostras de xarope e melaço de cana (VORLOVÁ et al., 2006; RISNER et al., 2006). Apesar da importância de se validar novos métodos analíticos, imposta pelos órgãos regulamentadores e pelos sistemas de gestão da qualidade, até o momento não foram encontrados estudos de validação para as metodologias cromatográficas já desenvolvidas por outros pesquisadores para xarope e melaço de cana.

A realização de estudos de validação intralaboratorial para novas metodologias é fundamental para garantir a viabilidade do método antes do exercício dispendioso de um ensaio colaborativo formal, e para fornecer evidência de confiabilidade se dados de ensaios interlaboratoriais não estão disponíveis. Estes fatos despertaram o interesse na realização de um estudo de validação intralaboratorial de um novo método de CLAE-UV para a determinação de HMF em mel, xarope e melaço de cana considerando as recomendações de artigos da literatura sobre validação (ARAUJO, 2009; GONZÁLEZ et al., 2010) e de guias e diretrizes do INMETRO (2011), ANVISA (2003), AOAC (2012) e NATA (2012) e aplicando-se diferentes ferramentas quimiométricas. Desta forma, neste capítulo será apresentado o estudo de validação do método de CLAE-UV para determinação de HMF em amostras de mel, xarope e melaço de cana bem como os resultados da aplicação do método validado as amostras descritas no capítulo 4.

## **5.1. Materiais e métodos**

### **5.1.1. Amostras**

Para o estudo de validação intralaboratorial da metodologia analítica foram escolhidas as amostras de mel (M1), de xarope de glicose (X1) e de melaço de cana (MC1) (Tabela 4.1).

### **5.1.2. Determinação de HMF por CLAE-UV**

#### **5.1.2.1. Reagentes**

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida pelo sistema Millipore Type 1 Ultrapure Water (resistividade da água ultrapura a 25°C: 18,2 MΩ.cm), modelo Simplicity UV.

Nos estudos de validação e aplicação da metodologia analítica foram utilizados padrão de 5-hidróximetil-2-furaldeído (HMF) 99,0% (m/m) (Sigma-Aldrich), acetonitrila grau HPLC 99,8% (EMD) e ácido fórmico 95,0% (Sigma-Aldrich).

#### **5.1.2.2. Equipamento e condições de análise**

As condições da análise por CLAE-UV foram validadas no Laboratório de Análises Químicas da Universidade de Manitoba, localizado na cidade de Winnipeg – Canadá. As condições cromatográficas foram estabelecidos de forma a permitir a separação do HMF de outros compostos em um tempo de eluição adequado (~4,6 minutos) utilizando condições cromatográficas citadas por diferentes autores (LEMOS et al., 2010; RISNER et al., 2006; DURMAZ e GÖKMEN, 2010; GASPAR e LUCENA, 2009) que foram previamente otimizadas no Laboratório CRONAT da Unicentro.

Os ensaios cromatográficos foram conduzidos em um cromatógrafo líquido modelo Breeze da Waters, com autosampler 2707 e bomba binária modelo 1525, acoplado a um detector UV (PDA modelo 2998). Para o estudo de validação da metodologia de CLAE-UV foi utilizada uma coluna cromatográfica C18 Luna da Phenomenex, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5,0 µm, termostatizada a 30°C. A análise cromatográfica foi realizada utilizando como fase móvel água (0,5% de ácido fórmico)/acetonitrila, na proporção

(90:10; v/v), com eluição isocrática, velocidade de fluxo da fase móvel de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $30,0 \text{ }\mu\text{L}$ . O comprimento de onda de detecção empregado foi de  $285 \text{ nm}$ .

### **5.1.2.3. Preparo das soluções das amostras**

As amostras analisadas apresentaram concentrações de HMF muito diferentes. Em vista disso, a concentração das soluções das amostras (Tabela 5.1) foi ajustada para assegurar que a área do pico do HMF nos cromatogramas estivesse dentro da faixa de áreas dos padrões usados para a construção da curva de calibração. As soluções padrão de HMF e as soluções das amostras foram preparadas em meio aquoso. Para os estudos de validação e aplicação da metodologia cromatográfica a concentração das soluções das amostras foi igual a  $0,2 \text{ g mL}^{-1}$  para as amostras de mel do Brasil, e de  $0,1$  a  $0,2 \text{ g mL}^{-1}$  para as amostras de mel do Canadá;  $0,002 \text{ g mL}^{-1}$  para as amostras de xarope de glicose do Brasil e  $0,06 \text{ g mL}^{-1}$  para as amostras de xarope dos Estados Unidos e Canadá; e de  $0,003$  a  $0,015 \text{ g mL}^{-1}$  para as amostras de melaço de cana do Brasil e de  $0,06 \text{ g mL}^{-1}$  para a amostra de melaço de cana do Canadá.

### **5.1.2.4. Validação Intralaboratorial do Método de CLAE-UV para Determinação de HMF em Mel, Xarope e Melaço de Cana**

A validação do método de CLAE-UV para a determinação de HMF em amostras de mel, xarope e melaço de cana foi realizada pela análise dos parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão.

#### **5.1.2.4.1. Seletividade**

Para a análise da seletividade do método foi preparada uma solução com padrão de HMF de  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ , a partir de uma solução estoque de  $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ , e a solução de cada uma das amostras analisadas (mel, xarope de glicose e melaço de cana) preparadas conforme descrito no item 5.1.2.3. A seletividade foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção do padrão de HMF e das soluções das amostras, bem como pela comparação dos espectros UV-PDA do padrão de HMF e das amostras.

#### 5.1.2.4.2. Linearidade

A linearidade da metodologia cromatográfica foi avaliada na faixa de 1,0 a 5,0 mg L<sup>-1</sup> a partir dos resultados da aplicação da técnica de regressão linear e do teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança aos dados de calibração obtidos por padronização externa (BARROS NETO et al., 2007; ARAUJO, 2009). Para testar a significância dos coeficientes da equação da curva de calibração (intercepto e sensibilidade do método) foi aplicado um teste-*t* e intervalos de confiança e de predição foram construídos no mesmo nível de confiança. Para a construção da curva de calibração preparou-se uma solução estoque de HMF de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> e desta foram retiradas alíquotas para a preparação de soluções padrão de HMF de 1,0 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Para cada ponto da curva de calibração foram preparadas três soluções padrão de HMF e cada uma destas soluções foi injetada em triplicata.

#### 5.1.2.4.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores de LD e de LQ foram obtidos utilizando-se os dados da equação da curva de calibração de acordo com ICH (1996) e Araujo (2009). A determinação dos respectivos limites foi realizada a partir do desvio padrão do intercepto e da inclinação da curva de calibração como ilustrado nas Equações 5.1 e 5.2:

$$LD = \frac{3 \cdot s}{b} \quad (\text{Equação 5.1})$$

$$LQ = \frac{10 \cdot s}{b} \quad (\text{Equação 5.2})$$

em que :

s = desvio padrão do intercepto da curva de calibração

b = inclinação da curva de calibração

#### 5.1.2.4.4. Precisão

A precisão do método de CLAE-UV foi avaliada pelo estudo de repetitividade e de precisão intermediária e pelo cálculo do valor de Horrat de acordo com AOAC (2012), González et al. (2010) e Jain e Arnold (2007). As estimativas da repetitividade e da precisão

intermediária foram obtidas pela preparação diária de 03 soluções de cada amostra (mel, xarope de glicose e melaço de cana) e injeção de cada solução em triplicata durante 05 dias. Aos dados obtidos foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) característica do planejamento hierárquico no nível de 95% de confiança. Os resultados da ANOVA foram utilizados para o cálculo dos desvios padrão relativos (RSD%) de repetitividade e da precisão intermediária e para o cálculo do valor Horrat conforme a Equação 5.3:

$$Horrat = \frac{RSD_{ri}}{PRSD_R} \quad (\text{Equação 5.3})$$

em que  $RSD_{ri}$  é o desvio padrão relativo para análises em dias diferentes, e  $PRSD_R$  é o desvio padrão relativo predito. O  $PRSD_R$  é dado por Jain e Arnold (2007) e apresentado na Equação 5.4:

$$PRSD_R \% = 2 C^{-0,15} \quad (\text{Equação 5.4})$$

#### 5.1.2.4.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio do estudo de recuperação por adição de padrão de acordo com NATA (2012), em que as soluções das amostras investigadas foram fortificadas com concentrações conhecidas de HMF em três níveis de concentração (1,0, 3,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>). Para cada nível de concentração foram preparadas 03 soluções das amostras de mel, de xarope de glicose e de melaço de cana e estas foram injetadas em triplicata. As porcentagens de recuperação (%) foram calculadas de acordo com a Equação 5.5 (NATA, 2012):

$$Rec (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100\% \quad (\text{Equação 5.5})$$

em que:

$C_1$  = concentração do analito na amostra fortificada;

$C_2$  = concentração do analito na amostra não fortificada;

$C_3$  = concentração do analito adicionado à amostra.

### **5.1.2.5. Análise Estatística**

Para verificar se haviam diferenças significativas entre os teores médios de HMF entre as amostras de mel, entre as amostras de xarope e entre as amostras de melaço de cana (Tabela 4.1) foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de um fator. Para identificar quais médias diferem entre si foi aplicada o teste Tukey de comparação múltipla de médias. Toda a análise estatística aplicada neste trabalho foi realizada no nível de 95% de confiança utilizando o software estatístico Minitab versão 16.2.2.

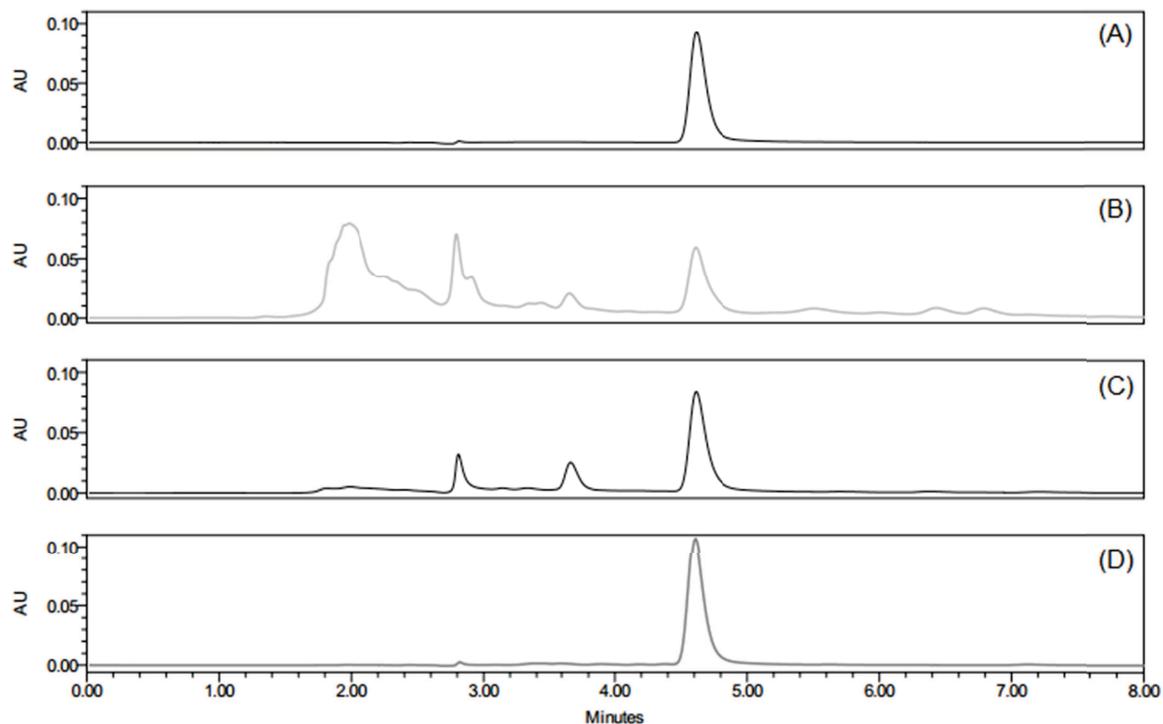
## **5.2. Resultados e Discussão**

Para o método de CLAE-UV adotado no presente trabalho foi realizado um estudo de validação intralaboratorial baseando-se em recomendações de artigos da literatura sobre validação (ARAUJO, 2009; GONZÁLEZ et al., 2010) e de guias e diretrizes do INMETRO (2011), ANVISA (2003), AOAC (2012) e NATA (2012). Foram adotados como parâmetros de validação: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

### **5.2.1. Seletividade**

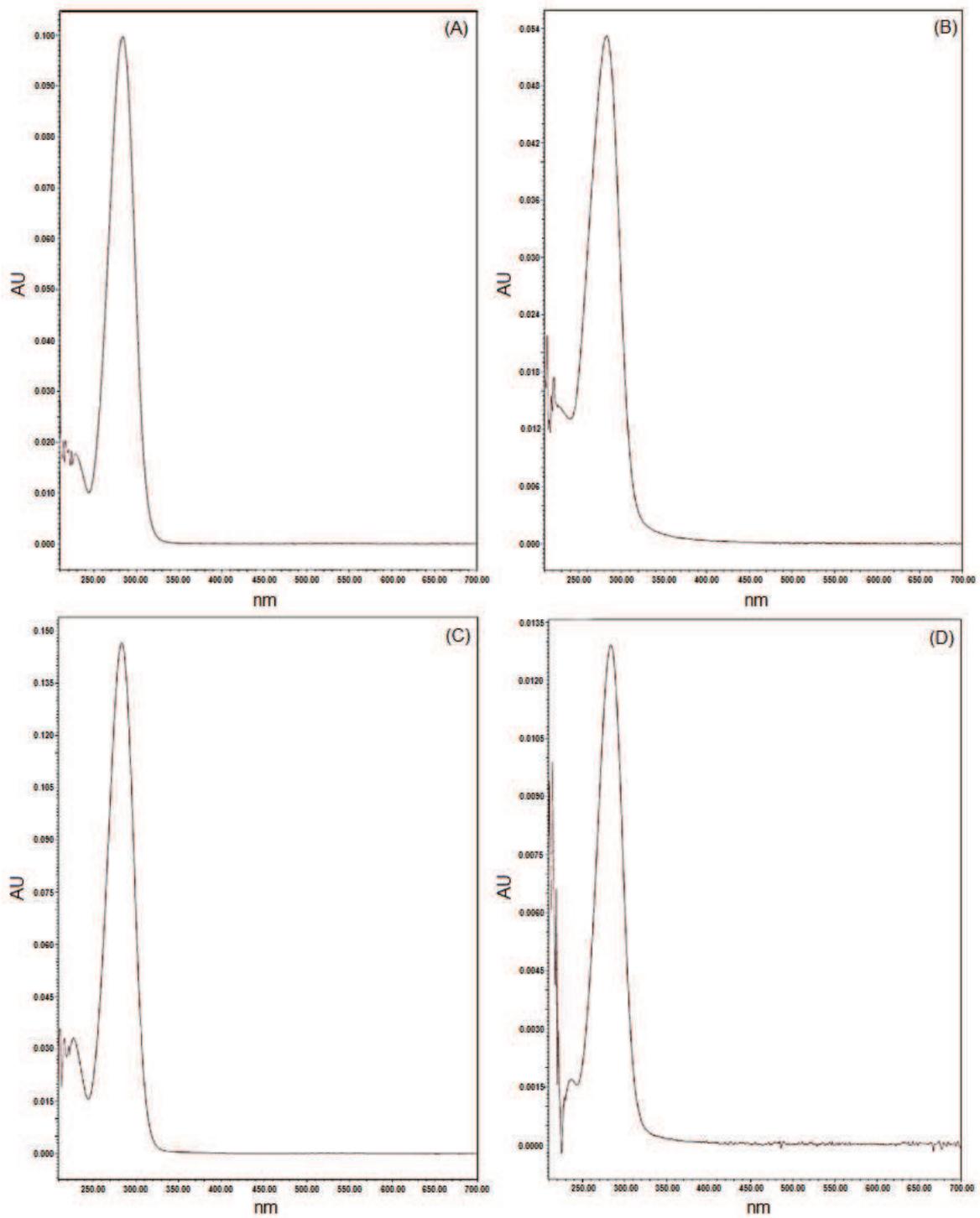
A seletividade do método foi determinada por meio da comparação dos tempos de retenção do HMF na solução padrão e nas amostras identificados nos cromatogramas monitorados em 285 nm para a solução do padrão de HMF e nos cromatogramas das soluções das amostras de mel (M1), xarope (X1) e melaço de cana (MC1), bem como, pela comparação dos espectros de absorção na faixa de 250 a 700 nm, apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2, respectivamente.

Na Figura 5.1-A foi observado que o cromatograma da solução padrão de HMF apresentou somente um pico bem definido, com tempo de retenção de 4,610 minutos, o que é indicativo de sua alta pureza. Este tempo de retenção foi considerado adequado, visto que permitiu a separação do analito em um tempo relativamente pequeno, o que torna o método proposto adequado para análises de controle de qualidade.



**Figura 5.1.** Cromatogramas detectados em 285 nm (A) do padrão de HMF, (B) do mel (M1), (C) do melão de cana (MC1) e (D) do xarope de glicose (X1).

A comparação dos tempos de retenção do HMF nos cromatogramas de mel (Figura 5.1-B), de melão de cana (Figura 5.1-C) e de xarope de glicose (Figura 5.1-D) mostrou que estes apresentam tempos de retenção de 4,626 minutos, 4,646 minutos e de 4,608 minutos, respectivamente. Esses tempos de retenção foram muito similares ao observado no cromatograma do padrão de HMF (4,610 minutos). A seletividade do método de determinação de HMF por CLAE-UV foi confirmada pelo perfil similar dos espectros UV-PDA do padrão de HMF e do pico atribuído ao HMF presente nas amostras, com máximo de absorção em 285 nm, os quais estão apresentados na Figura 5.2. Em vista destes resultados foi considerado que o método cromatográfico proposto apresenta seletividade adequada para a análise de HMF nas amostras investigadas.



**Figura 5.2.** Espectros UV-PDA do (A) padrão de HMF e das amostras de (B) mel (M1) , (C) xarope de glicose (X1) e (D) melaço de cana (MC1).

Os cromatogramas de mel (Figura 5.1-B) e de melaço de cana (Figura 5.1-D) mostraram ainda, a presença de outros picos que foram atribuídos a uma maior complexidade na composição destes alimentos em relação ao padrão de HMF. Apesar disso, foi observada

uma boa separação do pico de HMF destes compostos, fato que é concordante com o perfil dos espectros UV-PDA (Figura 5.2).

### 5.2.2. Linearidade

O estudo de linearidade permite verificar se a faixa de concentração em que se está trabalhando é adequada para o método que está sendo validado, isto é, se os resultados experimentais obtidos são proporcionais à concentração do analito de interesse (ANVISA, 2003; NATA, 2012). Para avaliar a linearidade do método de CLAE-UV foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de HMF na faixa de 1,0 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Aos dados do experimento de calibração (área do pico e concentração) foi ajustado um modelo linear pela aplicação da técnica de regressão linear no nível de 95% de confiança. Os resultados são apresentados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1.** Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança.

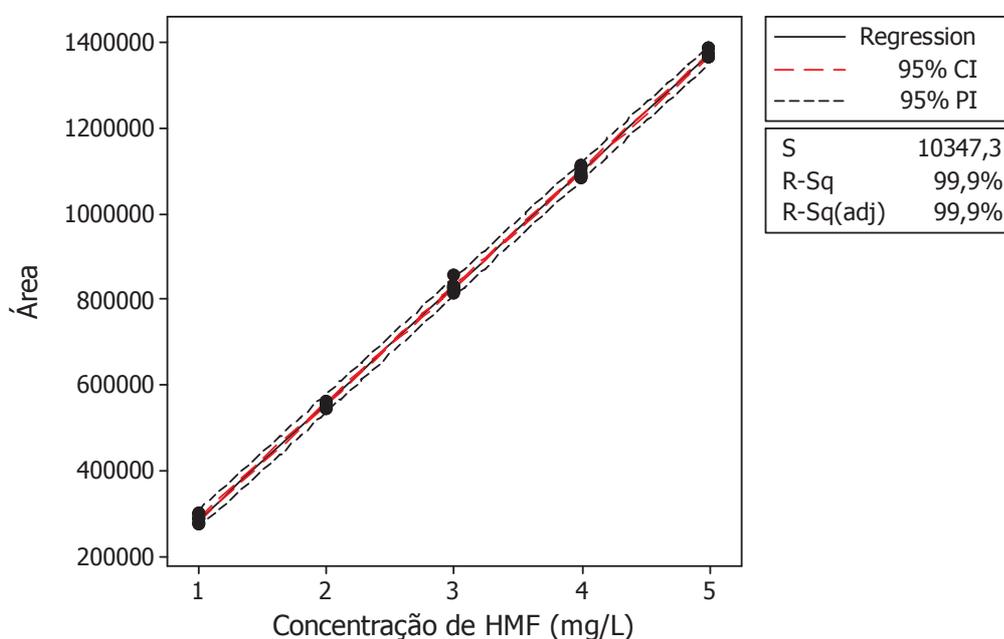
<i>Regressão*</i>		<i>Falta de ajuste**</i>		<i>r</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
<i>F</i> <sub>regressão</sub>	<i>valor de p</i>	<i>F</i> <sub>faj</sub>	<i>valor de p</i>	0,9997	99,9 %
62063,04	0,000	1,57	0,220		
<b>Coefficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão</b>				<i>t</i> <sub>observado***</sub>	<i>valor de p</i>
Intercepto : 13710 ± 3617				3,79	0,000
Inclinação: 271741 ± 1091				249,14	0,000

\**F*<sub>crítico (0,05; 1, 43)</sub> = 4,067; \*\**F*<sub>crítico (0,05; 3, 40)</sub> = 2,839; \*\*\**t*<sub>crítico (0,025;43)</sub> = 2,021

Para avaliar a linearidade do modelo gerado foi realizada uma análise de variância característica da regressão linear a 95% de confiança e foi aplicado um teste de falta de ajuste (*F*<sub>faj</sub>) para verificar se o modelo gerado era apropriado (Tabela 5.1). Os resultados indicam que o modelo linear é adequado para estabelecer a relação entre a área do pico cromatográfico do HMF e a concentração, pois apresentou valores para *F*<sub>faj</sub> não significativos no nível de 95% de confiança (*p* > 0,05). Este fato é ressaltado também pelo valor do *F*<sub>regressão</sub> altamente significativo (*p* = 0,000) observado no mesmo nível de confiança (Tabela 5.1). Em vista destes resultados, a significância dos coeficientes da calibração (intercepto e inclinação) foi verificada pela aplicação de um teste-*t* sobre cada coeficiente no mesmo nível de confiança (Tabela 5.1). A análise do teste-*t* indicou que os dois coeficientes (intercepto e inclinação) devem ser inseridos no modelo (*p* = 0,000). Estes resultados são ressaltados pelos valores bem inferiores dos erros padrão em relação aos valores de cada coeficiente. Desta forma, pode-se

concluir que a curva de calibração é linear na faixa de concentrações estudada, não passa pela origem e pode ser representada por:  $\text{área} = 13710 + 271741 * \text{concentração de HMF (mg L}^{-1}\text{)}$  (Figura 5.3). Sendo assim, pode-se afirmar que a curva analítica apresenta linearidade na faixa de concentrações investigada.

O modelo linear ajustado à curva analítica apresentou um coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9997 que está dentro dos limites recomendados ( $r > 0,99$ ) pela Anvisa (2003). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) determina a variabilidade dos dados experimentais que é explicada pelo modelo linear gerado (FREIRE et al., 1999). Neste estudo foi obtido um valor de  $R^2$  igual a 99,9% sugerindo que somente 0,1% da variação nos dados experimentais é explicada pelos resíduos (Tabela 5.1).



**Figura 5.3.** Reta da regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos de predição (IP) a 95% de confiança para a curva de calibração do método de CLAE-UV

### 5.2.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Para avaliar se o método proposto possibilitaria a determinação de HMF presente nas amostras em baixas concentrações foram calculados os limites de detecção e de quantificação. O LD é a concentração mínima do analito que o equipamento pode detectar sem necessariamente quantificar, enquanto que, o LQ é a concentração mínima do analito que o equipamento pode quantificar com precisão e exatidão (ANVISA, 2003). Os valores de LD e

LQ foram obtidos utilizando-se os dados da curva analítica e as Equações 5.1 e 5.2 apresentadas no item 5.2.2.4.3.

Os valores para LD e LQ, foram de 86,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 259,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Em trabalhos reportados por outros autores foram encontrados valores para LD e LQ para análise de HMF em mel, que variaram em um intervalo de 0,05-0,2  $\text{mg L}^{-1}$  para o LD e de 0,17-0,4  $\text{mg L}^{-1}$  para o LQ (LEMOS et al., 2010; RISNER et al., 2006; SPANO et al., 2006; TRUZZI et al., 2012). Diante disso, os valores obtidos experimentalmente encontram-se próximos aos reportados pela literatura para análise de HMF em mel, demonstrando que este método cromatográfico pode ser usado para a quantificação de HMF nesta matriz. Como não foram encontrados valores de LD e LQ para xarope e melaço na literatura, os resultados obtidos neste estudo para estes limites foram considerados adequados para a determinação deste contaminante nestes alimentos.

#### 5.2.4. Precisão

Para verificar a confiabilidade do método, foi realizado o estudo de precisão avaliando-se a repetitividade, no mesmo dia e a precisão intermediária, realizada em 05 dias diferentes. A literatura reporta que, para a precisão são aceitáveis valores de RSD (%) que estejam abaixo de 15% (ANVISA, 2003). Os resultados do estudo de precisão foram utilizados para obter os desvios padrão relativos (RSD%) para a repetitividade e para a precisão intermediária das amostras investigadas (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2.** Resultados do estudo de precisão (repetitividade e precisão intermediária) e valor de Horrat para o método de CLAE-UV.

Amostras	RSD (%)		Horrat
	Repetitividade	Precisão Intermediária	
Mel (M1)	0,72	1,84	0,33
Xarope de glicose (X1)	0,57	0,83	0,16
Melaço de cana (MC1)	1,95	6,43	0,59

As estimativas de RSD (%) para a repetitividade foram consideradas apropriadas (Tabela 5.2), visto que foram menores que os valores recomendados pela AOAC (2012) (RSD (%) < 3,7 para xarope de glicose, RSD (%) < 5,3 para melaço de cana e RSD (%) < 7,3 para mel). De forma similar, os resultados encontrados para o valor Horrat para análise de HMF em mel (0,33), xarope de glicose (0,16) e melaço de cana (0,59) também foram adequados,

visto que o limite aceitável para a precisão de análises intralaboratoriais deve ser menor que 1,3 (GONZÁLEZ et al., 2010). Portanto, estes resultados indicam que o método de CLAE-UV proposto apresenta precisão adequada para a análise de HMF nos alimentos analisados.

Alguns trabalhos encontrados na literatura para análise de HMF em mel apresentam valores de RSD (%) para a repetitividade e a precisão intermediária de 0,99-2,00% e 1,47-3,36%, respectivamente (SPANNO et al., 2006; RISNER et al., 2006; SPANNO et al., 2009). Gaspar e Lucena (2009) apresentaram valores para repetitividade e precisão intermediária, menores que 6,0% e 15,0%, respectivamente. Spanno et al. (2009) apresentou ainda o valor calculado para Horrat, que foi de 0,19 para a análise de HMF em mel. Observa-se que os resultados obtidos neste estudo para os teores de HMF em amostras de mel foram similares aos reportados na literatura. Todavia, para análise em melaço de cana foram observados os maiores valores de RSD (%) para repetitividade e precisão intermediária. Sugere-se que isto esteja relacionado ao fato desta matriz apresentar uma maior complexidade em sua composição química em relação aos outros alimentos investigados, bem como maior quantidade de componentes em suspensão, como as fibras provenientes da cana (CARVALHO, 2007), conferindo-lhe menor homogeneidade, o que pode afetar a precisão do método.

#### **5.2.5. Exatidão**

A exatidão do método foi avaliada, por meio da realização dos testes de recuperação por adição de padrão em três níveis de concentração (1,0, 3,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) para as três matrizes investigadas: mel, xarope de glicose e melaço de cana. Os valores de recuperação foram determinados segundo a Equação 5.5 (NATA, 2012), apresentada no item 5.1.2.4.5. De acordo com a literatura, os limites de recuperação considerados adequados para o nível de concentração de HMF presente nas amostras investigadas são de 80-110% (JAIN E ARNOLD, 2007; AOAC, 2012). A Tabela 5.3 apresenta as recuperações porcentuais obtidas no presente estudo.

**Tabela 5.3.** Valores de Recuperação (%) para determinação de HMF em mel, xarope de glicose e melaço de cana do método de CLAE-UV.

Amostras	% Recuperação		
	1,0 mg L <sup>-1</sup>	3,0 mg L <sup>-1</sup>	5,0 mg L <sup>-1</sup>
Mel (M1)	101,58	91,03	89,43
Xarope de glicose (X1)	104,43	102,09	101,44
Melaço de cana (MC1)	101,43	101,99	100,33

Os resultados sugerem que o método proposto apresenta exatidão adequada considerando-se que as recuperações percentuais obtidas para mel (89-102%), xarope de glicose (101-105 %) e melaço de cana (100-102%), para as três concentrações de padrão de HMF adicionadas encontram-se dentro dos limites aceitáveis (Tabela 5.3). Em trabalhos reportados por outros autores para a análise de HMF em mel foram obtidos valores de recuperação similares aos determinados neste estudo para mel na faixa de 91,6 a 104,98% (LEMOS et al., 2010; SPANO et al., 2006; RISNER et al., 2006). Desta forma, estes resultados indicam que o método de CLAE-UV proposto apresenta exatidão adequada para a análise de HMF nos alimentos investigados.

### **5.3. Aplicação do Método Validado de CLAE-UV as amostras de Mel, de Xarope e de Melaço de Cana.**

Após a realização do estudo de validação intralaboratorial do método de CLAE-UV para determinação de HMF em mel, xarope e melaço de cana, o mesmo foi aplicado a todas as amostras adquiridas no Brasil e no Canadá, descritas no Capítulo 4. Os teores de HMF foram determinados em triplicata, utilizando-se as condições cromatográficas validadas descritas no item 5.2 e são apresentados na Tabela 5.4 como médias, desvios padrão e intervalos de variação.

**Tabela 5.4.** Teores de HMF de amostras de mel, de xarope e de melaço de cana determinados pelo método de CLAE-UV.

<b>Amostras</b>	<b>Teores de HMF <math>\pm</math> DP (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
M1	13,12 $\pm$ 0,09
M2	5,88 $\pm$ 0,13
M3	84,39 $\pm$ 0,70
M4	36,44 $\pm$ 0,39
M5	21,56 $\pm$ 0,23
M6	11,59 $\pm$ 0,64
M7	41,64 $\pm$ 2,56
M8	49,75 $\pm$ 2,97
M9	12,98 $\pm$ 0,55
Intervalo de Variação	5,88 - 84,39
X1	1655,88 $\pm$ 7,14
X2	1086,90 $\pm$ 3,57
X3	1627,95 $\pm$ 3,45
X4	50,37 $\pm$ 0,59
X5	ND*
X6	2121,29 $\pm$ 2,47
X7	406,60 $\pm$ 2,26
X8	1642,55 $\pm$ 5,14
Intervalo de Variação	ND* - 2121,29
MC1	536,43 $\pm$ 2,01
MC2	115,07 $\pm$ 0,08
MC3	893,14 $\pm$ 5,47
MC4	109,25 $\pm$ 1,03
MC5	593,31 $\pm$ 0,48
MC6	20,90 $\pm$ 2,27
MC7	460,87 $\pm$ 2,42
Intervalo de Variação	20,90 - 893,14

\*ND = não detectado

A análise dos resultados apresentados na Tabela 5.4 permitiu realizar algumas considerações quanto aos teores médios de HMF encontrados nas amostras de mel, de xarope e de melaço de cana. De forma geral, foi observado que as amostras de mel (M1 a M9) apresentaram os menores teores de HMF, enquanto que as amostras de xarope produzidas no Brasil (X1 a X3 e X6 a X8) apresentaram os teores mais elevados deste contaminante. Segundo o Codex Alimentarius, através da Diretiva da Comunidade Européia 2001/110/CE de 20 de dezembro de 2001 (CE, 2002), o limite máximo estabelecido para HMF em mel é de 40,0 mg kg<sup>-1</sup>. Para este alimento é possível encontrar na literatura, estudos que apresentam teores de HMF na faixa de <LD - 1131,76 mg kg<sup>-1</sup> (SPANO et al., 2006; RISNER et al.,

2006; GASPAR e LUCENA, 2009; ZAPPALÀ et al., 2005, SPANO et al., 2009; TRUZZI et al., 2012; MAKAWI et al., 2009; KHALIL et al., 2010).

Estudos realizados por outros pesquisadores encontraram um intervalo de variação para a concentração de HMF em xaropes entre 1,30 a 1410,0 mg kg<sup>-1</sup> (VORLOVÁ et al. 2006; RISNER et al., 2006). Diante disso, observa-se que algumas das amostras analisadas tiveram valores de HMF, acima das recomendações obtidas para alimentos e acima dos teores encontrados por outros autores. As amostras de melaço de cana, por sua vez apresentaram valores intermediários em uma ampla faixa de variação (20,90 a 893,14 mg kg<sup>-1</sup>) com valores máximos de HMF superiores aos encontrados em outros trabalhos (100,0 a 300,0 mg kg<sup>-1</sup>) (KOWALSKI et al., 2013).

O amplo intervalo de variação nos teores de HMF encontrados no presente estudo sugere que existem diferenças significativas no teor deste contaminante entre os alimentos investigados. Para confirmar tal hipótese foi aplicada uma ANOVA de um fator no nível de 95% de confiança para cada um dos alimentos analisados e os resultados são apresentados na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5.** ANOVA e teste Tukey a 95% de confiança para os teores de HMF das amostras de mel, de xarope e de melaço de cana determinados por CLAE-UV.

Amostra	$F_{observado}$	$P$	Teste Tukey								
Mel	895,51	0,000	M3	M8	M7	M5	M1	M9	M6	M4	M2
			A	B	C	D	E	E	E	F	F
										G	G
Xarope	142212,67	0,000	X6	X1	X8	X3	X2	X7	X4	X5	
			A	B	C	D	E	F	G		
											H
Melaço de cana	41970,62	0,000	MC3	MC5	MC1	MC7	MC2	MC4	MC6		
			A	B	C	D	E	E			
											F

A análise dos dados apresentados na Tabela 5.5 sugeriu que existem diferenças significativas nos teores de HMF entre as amostras de mel ( $F_{obs} = 895,51; p = 0,000$ ), entre as amostras de xarope ( $F_{obs} = 142212,67; p = 0,000$ ) e entre as amostras de melaço de cana ( $F_{obs} = 41970,62; p = 0,000$ ) no nível de 95% de confiança. Para identificar quais médias diferem entre si foi aplicado o teste de Tukey (Tabela 5.5) no mesmo nível de confiança. Desta forma, foi observado que as amostras M1, M6 e M9, as amostras M4 e M6, as amostras M2 e M4 e as amostras MC2 e MC4 não apresentam teores médios de HMF significativamente diferentes entre si.

#### 5.4. Conclusões parciais

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo foi possível validar de forma intralaboratorial um método de CLAE-UV para determinação de HMF em amostras de mel, de xarope e de melaço de cana com excelente precisão e exatidão, boa linearidade, sensibilidade e seletividade, mesmo na presença de outros compostos interferentes de natureza desconhecida. Além disso, foi possível determinar os teores de HMF pelo método validado de CLAE-UV nas três matrizes investigadas. Outras vantagens do método proposto em relação a trabalhos publicados na literatura foram a rapidez da análise e a não aplicação de qualquer tipo de preparo de amostra.

#### 5.5. Referências

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

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em: maio, 2013.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th Edition. 2012. APÊNDICE F.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and evaluation. *Journal of Chromatography B*. v. 877. p. 2224-2234. 2009.

BARROS NETO, B. de; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 3 ed. Campinas, São Paulo: Editora da Unicamp, 2007.

- CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*. v. 44. p. 793-810. 2011.
- CARVALHO, R. F. Beneficiamento dos derivados da cana de açúcar (melado e açúcar mascavo). 2007. 21f. (Dossiê Técnico) – Rede de Tecnologia da Bahia-RETEC/BA, Bahia.
- CE-Comunidade Européia. Directiva 2001/110/CE de 20 de dezembro de 2001. Jornal Oficial das Comunidades Européias. 2002.
- DURMAZ, G.; GÖKMEN, V. Determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural and 2-furfural in oils as indicators of heat pre-treatment. *Food Chemistry*. v. 123. p. 912-916. 2010.
- FREIRE, C. A. de L.; CHARNET, E. M. R.; BONVINO, H.; CHARNET, R. Análise de modelos de regressão linear. Campinas, São Paulo: Editora Unicamp, 1999.
- GASPAR, E. M. S. M.; LUCENA, A. F. F.; Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry*. v. 114. p. 1576–1582. 2009.
- GÖKMEN, V.; SENYUVA, H.Z. Improved method for the determination os hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 54., n. 8, p. 2845-2849. 2006.
- GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. *Talanta*. v. 82. p. 1995–1998. 2010.
- ICH - International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96), 1996.
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE008 – Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 04, julho/2011.
- JAIN, A. V.; ARNOLD, B. Basic concepts of analytical toxicology. Editado por Ramesh C. Gupta. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. New York: Elsevier, 2007.
- KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and Chemical Toxicology*. v. 48. p. 2388–2392. 2010.
- KOWALSKI, S.; LUKASIEWICZ, M.; DUDA-CHODAK, A.; ZIEĆ, G. 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) – Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation: a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*. v. 63. p. 0-0. 2013.
- LEMOES, G. da S.; SANTOS, J. S. dos; SANTOS, M. L. P. dos; Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. *Química Nova*. v. 33. n. 8. p. 1682-1685. 2010.
- MAKAWI, S. Z. A.; TAHA, M. I.; ZAKARIA, B. A.; SIDDIG, B.; MAHMUD, H.; ELHUSSEIN, A. R. M.; KARIEM, E. <sup>a</sup> G.; Identification and quantification of 5-Hydroxymethyl Furfural HMF in some sugar-containing food products by HPLC. *Pakistan Journal Nutrition*. v. 8. n. 9. p. 1391-1396. 2009.

NATA. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. 2012.

RISNER, C. H.; KISER, M. J.; DUBE, M. F. An Aqueous High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey and Other Sugar-containing Materials. *Journal of Food Science*. v. 71. n. 3. p. 179-184. 2006.

SPANO, N.; CASULA, L.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SCANU, R.; TAPPARO, A.; SANNA, G. An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey: The case of strawberry tree honey. *Talanta*. v. 68. p. 1390-1395, 2006.

SPANO, N.; CIULU, M.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SALIS, S.; SANNA, G. A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey. *Talanta*. v. 78. p. 310-314, 2009.

TRUZZI, C.; ANNIBALDI, A.; ILLUMINATI, S.; FINALE, C.; ROSSETTI, M.; SCARPONI, G. Determination of Very Low Levels of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) in Natural Honey: Comparison Between the HPLC Technique and the Spectrophotometric White Method. *Journal of Food Science*. v. 77. p. 784-790. 2012.

VORLOVÁ, L.; BORKOVCOVÁ, I.; KALÁBOVÁ, K.; VEČEREK, V. Hydroxymethylfurfural contents in foodstuffs determined by HPLC method. *Journal of Food and Nutrition Research*. v. 45. n.1. p. 34-38. 2006.

ZAPPALÀ, M.; FALLICO, B.; ARENA, E.; VERZERA, A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*. v. 16. p. 273-277. 2005.

**CAPÍTULO 6. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM  
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE HMF EM  
XAROPE**

## **6. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE HMF EM XAROPE**

Diante da preocupação da comunidade científica, quanto à toxicidade do HMF, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias que sejam de fácil realização, de baixo custo e que apresentem bons resultados. Embora os métodos cromatográficos sejam muito utilizados, o método espectrofotométrico mostra-se uma alternativa vantajosa, principalmente devido a seu menor custo por análise e sua simplicidade de execução.

O método espectrofotométrico modificado de White (1979) é um dos métodos espectrofotométricos oficiais para a determinação de HMF em mel indicado pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) e Comissão Internacional de Mel (BOGDANOV, 1997) (SILVA et al., 2008). Este método foi desenvolvido para mel, com utilização de soluções de Carrez I e Carrez II como clarificante. Para a determinação de HMF é realizada a leitura da amostra e da referência na região de absorção do UV, em comprimentos de onda de 284 e 336 nm, respectivamente (WHITE, 1979). Considera-se ainda que este método foi desenvolvido somente para mel, não encontrando-se na literatura trabalhos relacionados à aplicação desta metodologia para xarope.

Diante disso, a otimização e validação de um método espectrofotométrico para xarope torna-se uma alternativa promissora. Além disso, realizar um estudo de validação torna-se importante, visto que não foram encontrados estudos desse tipo para esta matriz. Dessa forma, torna-se necessário fazer um estudo de validação intralaboratorial de um novo método espectrofotométrico para a determinação de HMF em xarope considerando as recomendações de artigos da literatura sobre validação (ARAUJO, 2009; GONZÁLEZ et al., 2010) e de guias e diretrizes do INMETRO (2011), ANVISA (2003), AOAC (2012) e NATA (2012) e aplicando-se diferentes ferramentas quimiométricas. Assim, neste capítulo serão apresentados os estudos de otimização e validação do método espectrofotométrico para a determinação de HMF em xarope bem como, os resultados da aplicação do método validado às amostras descritas no capítulo 4.

## **6.1. Materiais e Métodos**

### **6.1.1. Amostras**

Para os estudos de otimização e validação da metodologia espectrofotométrica foi utilizada a amostra de xarope X1 e para a aplicação do método validado as amostras X1 a X8, as quais foram descritas no Capítulo 4.

### **6.1.2. Reagentes**

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida pelo sistema TKA-GenPure (Thermo Scientific, Alemanha).

Na otimização e validação da metodologia analítica foi utilizado padrão de 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) 99,0% (m/m) da Sigma Aldrich e metabissulfito de sódio 97,0% (m/m) da Biotec.

### **6.1.3. Preparo das soluções**

As soluções padrão de HMF foram preparadas diariamente a partir de diluições de uma solução estoque de  $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$  preparada com padrão de HMF comercial. Para a otimização do método foram preparadas soluções de metabissulfito de sódio nas concentrações de 0,005%, 0,010%, 0,020%, 0,050%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,30% e 0,40%, a partir de uma solução estoque de 0,40% (m/v) e uma solução padrão de HMF  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Para o estudo de validação intralaboratorial foram preparadas soluções da amostra de xarope de glicose X1 de concentração igual a  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para a aplicação da metodologia espectrofotométrica validada foram preparadas soluções de xarope de  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$  para as amostras provenientes do Brasil (X1 a X4 e X6 a X8) e soluções de xarope de  $160,0 \text{ mg mL}^{-1}$  para as amostras oriundas do Canadá (X4 e X5). Todas as soluções foram preparadas em meio aquoso.

#### 6.1.4. Equipamentos

A determinação de HMF em amostras de xarope foi realizada em um espectrofotômetro de feixe simples de marca Varian, modelo UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Bio localizado no Laboratório de Multiusuários e em um espectrofotômetro de feixe simples marca Spectrum Meter, modelo SP-2000 UV, localizado no Laboratório de Análise de Traços e Instrumentação (LabGati), ambos da Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro, Campus Cedeteg.

#### 6.1.5. Estudo de Otimização

O método espectrofotométrico de absorção na região do UV proposto neste trabalho para a determinação de HMF em amostras de xarope foi baseado no método espectrofotométrico modificado de White (1979) desenvolvido para mel. Primeiramente foi realizado um estudo de otimização da concentração de metabissulfito de sódio (% m/v) a ser adicionada à solução de mel necessária para produzir concentrações de HMF nas amostras de xarope similares às determinadas por CLAE-UV (método de referência).

Para o estudo de otimização foi preparada uma solução padrão de HMF de  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ , a partir de uma solução estoque de  $1000,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Em seguida, foram preparadas soluções de metabissulfito de sódio nas concentrações de 0,005%, 0,010%, 0,020%, 0,05%, 0,10%, 0,15%, 0,2%, 0,3% e 0,4% (m/v), a partir de uma solução estoque de 0,40% (m/v). Utilizou-se 10 tubos de ensaio para as análises. Em todos os tubos de ensaio foram adicionados 5,0 mL de solução padrão de HMF  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ . No primeiro tubo foram adicionados 5,0 mL de água ultrapura e nos demais, adicionou-se 5,0 mL de cada uma das soluções de metabissulfito de sódio descritas acima. Em seguida foi determinada a absorbância das soluções investigadas no comprimento de onda de 285 nm utilizando-se água como branco. O procedimento adotado está representado na Figura 6.1.

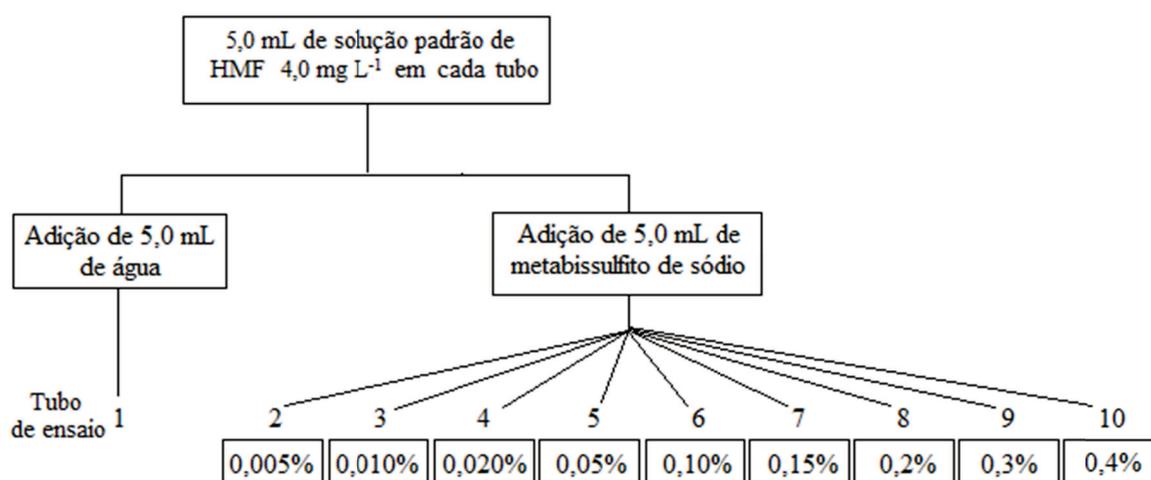
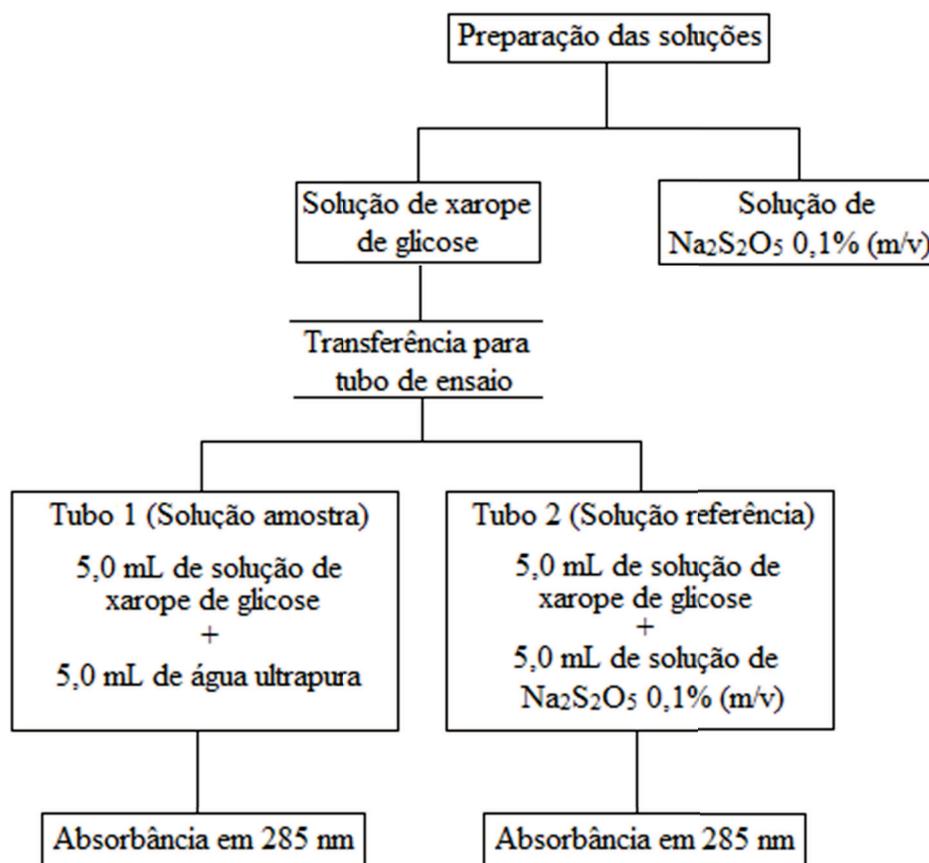


Figura 6.1. Fluxograma do procedimento de otimização da concentração de metabissulfito de sódio

As absorvâncias obtidas para a solução padrão de HMF  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  sem adição de metabissulfito de sódio e adicionada das soluções de metabissulfito de sódio em diferentes concentrações foram utilizadas para a construção de um gráfico da absorvância em  $285 \text{ nm}$  versus a concentração de metabissulfito ( $\%$ ,  $\text{m/v}$ ). Este gráfico permitirá determinar a concentração ótima deste reagente para as análises espectrofotométricas.

### 6.1.6. Determinação Espectrofotométrica de HMF em Xarope

As concentrações de HMF nas amostras de xarope foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por White (1979) com modificações na massa da amostra (conforme item 6.1.3) e na concentração da solução de metabissulfito de sódio (como descrito no item 6.1.5). Primeiramente construiu-se uma curva de calibração por padronização externa, na faixa de  $2,0$  a  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de HMF. As soluções padrão de HMF foram obtidas a partir de uma solução estoque de  $1000,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Posteriormente, foi preparada a solução da amostra de xarope, como descrito no item 6.1.3. Em seguida, preparou-se uma solução de metabissulfito de sódio  $0,1 \%$  ( $\text{m/v}$ ). O fluxograma para a determinação de HMF em xarope pelo método espectrofotométrico proposto está representado na Figura 6.2.



**Figura 6.2.** Fluxograma do procedimento adotado para a determinação espectrofotométrica de HMF em amostras de xarope

A absorbância resultante da subtração dos valores de absorbâncias da solução amostra e da solução de referência (Figura 6.2) em 285 nm foi utilizada para determinar a concentração de HMF ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nas amostras de xarope fazendo uso da curva de calibração.

### 6.1.7. Estudo de Validação Intralaboratorial

A validação intralaboratorial do método espectrofotométrico proposto foi realizada determinando-se os parâmetros de validação: linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão.

#### 6.1.7.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada na faixa de concentrações de 2,0 a 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  como descrito no item 5.2.2.4.2.

### 6.1.7.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Os valores de LD e de LQ foram obtidos utilizando-se o método da curva de calibração como descrito no item 5.2.2.4.3.

### 6.1.7.3. Precisão

A precisão foi avaliada pelo estudo da repetitividade e da precisão intermediária. A repetitividade foi analisada pelo preparo de três réplicas verdadeiras da solução de xarope no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada pelos resultados da aplicação de um planejamento hierárquico que considerou quatro fatores que contribuem para a variabilidade dos resultados dentro do laboratório, sendo eles: analista, equipamento, dia e réplicas (KUTTATHARMMAKUL et al., 1999). Para a precisão intermediária cada um dos  $m$  analistas ( $m = 2$ ) preparou  $n$  réplicas ( $n = 3$ ) das soluções da amostra de xarope em  $p$  dias ( $p = 5$ ) e realizou a medida dos valores de absorvância em  $q$  espectrofotômetros diferentes ( $q = 2$ ). O modelo hierárquico para a análise da precisão está apresentado na Figura 6.3.

Aos dados obtidos foi aplicada uma ANOVA característica do planejamento hierárquico, no nível de 95% de confiança para verificar se existem diferenças significativas entre os diferentes equipamentos, analistas e dias, bem como determinar os componentes de variância para cada fator avaliado. Os resultados da ANOVA serão utilizados também para obter as estimativas de repetitividade e de precisão intermediária que serão expressas em desvios padrão relativos (RSD %), e pelo valor Horrat por meio das Equações 5.3 e 5.4, apresentadas no item 5.2.2.4.4.

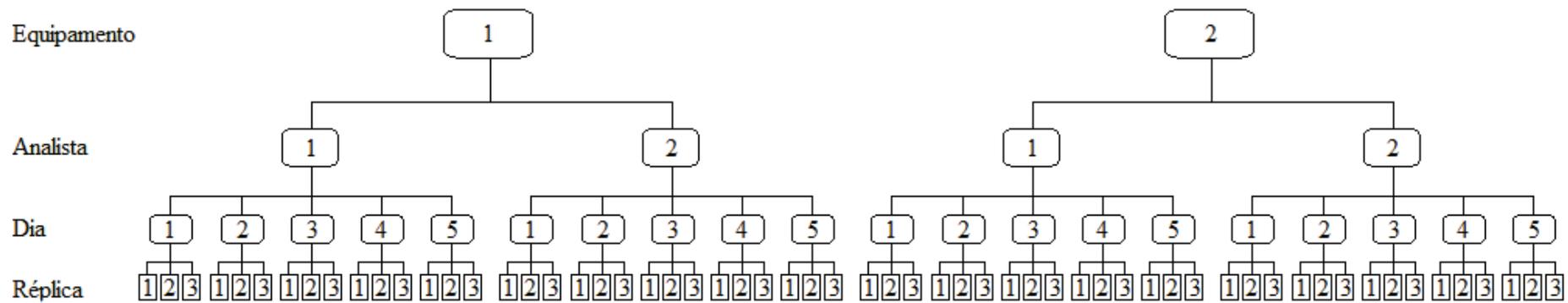


Figura 6.3. Modelo hierárquico aplicado para obter estimativas da precisão intermediária do método espectrofotométrico de determinação de HMF em xarope

#### 6.1.7.4. Exatidão

A exatidão da metodologia desenvolvida foi avaliada por meio da comparação dos teores de HMF obtidos pelo método espectrofotométrico otimizado com os determinados pelo método de CLAE-UV para as amostras de xarope, descritas no Capítulo 4. Neste estudo o método de CLAE-UV foi adotado como método de referência por ser considerado mais seletivo e exato. Para avaliar a significância dos resultados foi aplicado um *teste-t* pareado no nível de 95% de confiança. A exatidão também foi avaliada pelos resultados da aplicação da técnica de regressão linear no mesmo nível de confiança aos teores de HMF obtidos pelos dois métodos analíticos e pelo cálculo de taxas de recuperação do método espectrofotométrico de acordo com a equação 6.1:

$$Rec (\%) = \frac{C_1}{C_2} \times 100\% \quad (\text{Equação 6.1})$$

Em que:

$C_1$  = concentração do analito determinada pelo método espectrofotométrico

$C_2$  = concentração do analito determinada pelo método de CLAE-UV

#### 6.1.7.5. Análise Estatística

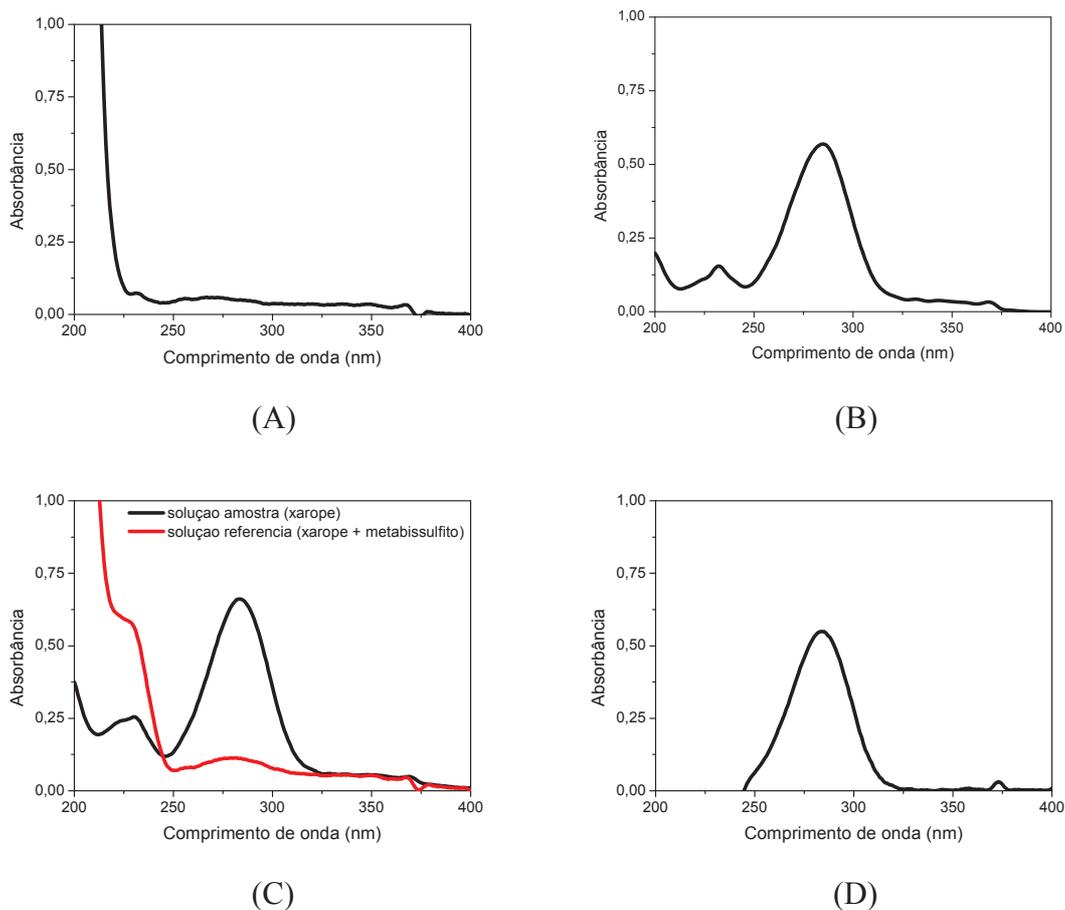
Toda a análise estatística aplicada neste capítulo foi realizada no nível de 95% de confiança utilizando o software estatístico Minitab versão 16.2.2.

### 6.2. Resultados e Discussão

#### 6.2.1. Estudo de Otimização

O método espectrofotométrico proposto neste estudo para a determinação de HMF em amostras de xarope foi baseado no método modificado de White (1979). Inicialmente foram realizados alguns ensaios preliminares para verificar se seria possível quantificar o HMF presente em amostras de xarope por esta metodologia.

Foram realizados os espectros de varredura para a solução de padrão de HMF 4,0 mg L<sup>-1</sup>, para a solução de metabissulfito 0,1 (% m/v) e para a solução de xarope X1 5,0 mg mL<sup>-1</sup> (% m/v) antes e após a adição da solução de metabissulfito, para posterior subtração dos mesmos. Os espectros são apresentados na Figura 6.4.



**Figura 6.4.** Espectros de varredura (A), da solução de metabissulfito de sódio 0,1(% m/v), (B) da solução de padrão de HMF 4,0 mg L<sup>-1</sup> (C) da solução amostra (solução de xarope 5,0 mg mL<sup>-1</sup>) e da solução referência (solução de xarope após a adição da solução de metabissulfito de sódio) e (D) espectro resultante da subtração dos espectros mostrados em (C)

Como é possível observar na Figura 6.4-B, o espectro para a solução de padrão de HMF 4,0 mg L<sup>-1</sup>, mostra uma banda de absorção elevada no comprimento de onda de 285 nm, característico do HMF. Na Figura 6.4-A, o espectro para a solução de metabissulfito de sódio 0,1 (% m/v) mostra uma forte banda de absorção abaixo de 230 nm, e uma banda de absorção fraca em 270 nm. Este comportamento é característico do íon bissulfito e foi observado também por White (1979) durante o desenvolvimento do método espectrofotométrico para determinação de HMF em mel.

Na Figura 6.4-C é apresentado o efeito da adição de metabissulfito de sódio ao espectro da solução de xarope (solução amostra). Foi possível observar no espectro da solução amostra uma forte banda de absorção em 285 nm e uma banda de absorção fraca em 230 nm. Após a adição da solução de metabissulfito foi verificado no espectro da solução referência uma redução significativa na intensidade da banda em 285 nm atribuída ao HMF enquanto

que a banda em 230 nm teve sua intensidade triplicada. Resultados similares foram observados também por White (1979). Isso ocorre porque o íon bissulfito adicionado à solução da amostra reage com o HMF presente, promovendo a quebra da dupla ligação do aldeído e ligando-se à molécula de HMF, destruindo assim o grupo cromóforo (WHITE, 1979) como pode ser visualizado na Figura 3.1 no item 3.1.2.

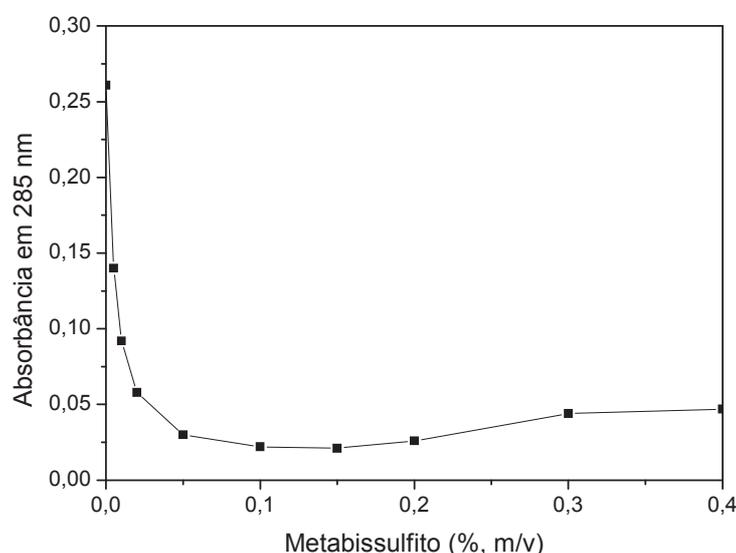
O uso de um espectro gerado pela diferença entre os espectros da solução amostra e da solução de referência foi utilizado por White (1979) como um artifício para eliminar a contribuição de outros constituintes presentes no mel e assim poder fazer uso de uma massa de amostra maior, o que poderia aumentar a sensibilidade do método, especialmente para baixas concentrações de HMF (Capítulo 3, Figura 3.2) (WHITE, 1979). Nesse espectro foi observada além da banda de absorção do HMF em 284 nm uma absorção não específica na faixa de 320 a 340 nm. Dessa forma, para evitar a interferência dessa absorção acima de 300 nm, White (1979) sugeriu utilizar a absorbância resultante da subtração da absorbância medida em 284 nm daquela obtida em 336 nm e fazer a quantificação do HMF considerando a sua absorvidade molar teórica, sem necessidade então do uso de curva de calibração (WHITE, 1979).

Na Figura 6.4-D foi observado que o espectro resultante da subtração do espectro da solução amostra (solução de xarope) do espectro da solução de referência (solução de xarope adicionada de solução de metabissulfito) apresentou um comportamento similar ao obtido por White (1979) e mostrado na Figura 3.2. No entanto, acima de 300 nm não foi observada a absorbância não específica sugerindo que a determinação de HMF em xarope pode ser realizada utilizando somente a absorbância medida em 285 nm.

Para o método espectrofotométrico proposto neste trabalho optou-se pelo uso de curva de calibração para a obtenção das concentrações de HMF nas amostras de xarope. Esta escolha se deve ao fato do método modificado de White (1979) considerar que toda a absorbância do HMF medida em 284 nm na solução de mel seja eliminada pela reação com o íon bissulfito, o que possibilitaria o uso da absorvidade molar teórica deste composto, o que em solução não é completamente verdadeiro, já que foi observada uma redução de somente 94,3% na banda característica do HMF (WHITE, 1979). Sendo assim, foi construída uma curva de calibração de 2,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> e os teores de HMF foram calculados a partir desta. Além disso, a massa de xarope utilizada para as análises foi modificada, visto que os valores de absorbância obtidos para as amostras de xarope provenientes do Brasil foram

extremamente elevados, e a necessidade de várias etapas de diluições proporcionaria erros aos resultados obtidos (MITRA, 2003).

Uma vez que foi verificado que seria possível determinar a concentração de HMF em amostras de xarope nos ensaios preliminares, então foi realizado um estudo de otimização para verificar qual a concentração de metabissulfito produziria a maior redução na banda característica de absorção deste contaminante. Para este estudo foi utilizada uma solução padrão de HMF  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ , a qual foram adicionadas quantidades variáveis da solução de metabissulfito entre 0,005 % (m/v) até 0,40% (m/v) (Figura 6.5).



**Figura 6.5.** Efeito da concentração de metabissulfito (% m/v) sobre a absorbância do HMF em 285 nm.

A análise da Figura 6.5 sugere que a maior redução da banda característica do HMF em 285 nm é obtida quando são adicionadas concentrações de metabissulfito de 0,10 (% m/v) e 0,15 (% m/v), as quais fornecem a melhor razão entre eficácia e interferência. Acima destas concentrações observa-se uma menor redução da banda de absorção indicando uma pequena interferência do íon bissulfito residual na solução. Para melhor avaliar o comportamento ilustrado na Figura 6.5 foi calculada a redução (%) da banda de absorção do HMF em 285 nm, e os resultados são apresentados na Tabela 6.1.

**Tabela 6.1.** Redução (%) da banda de absorção do HMF em 285 nm pela adição de soluções de metabissulfito de diferentes concentrações.

<b>Concentração de metabissulfito de sódio (%, m/v)</b>	<b>Redução (%) da Absorbância em 285 nm</b>
0,005	46,36
0,010	64,75
0,020	77,78
0,050	88,51
0,10	91,57
0,15	91,95
0,20	90,04
0,30	83,14
0,40	81,99

A Tabela 6.1, confirmou o comportamento ilustrado na Figura 6.5, ressaltando que as maiores taxas de redução da banda de absorção do HMF em 285 nm ocorrem pela adição de soluções de metabissulfito com concentrações de 0,10 (% m/v) e 0,15 (% m/v). Dessa forma, escolheu-se trabalhar com a solução de metabissulfito de sódio 0,10 (% m/v) visto que a diferença entre os valores de absorbância obtidos para esta concentração e a concentração de 0,15 (% m/v) foi pequena, permitindo também uma menor utilização de reagente ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) para a reação e portanto, minimizando a interferência do mesmo.

### **6.2.2. Validação Intralaboratorial do Método Espectrofotométrico para Determinação de HMF em Xarope**

Para a validação intralaboratorial do método espectrofotométrico proposto e otimizado no item 6.2.1. foram avaliados os parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

#### **6.2.2.1. Linearidade**

O estudo da linearidade do método espectrofotométrico foi realizado construindo-se uma curva de calibração por padronização externa, na faixa de 2,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Aos dados do experimento de calibração (absorbância e concentração) foi ajustado um modelo linear pela aplicação da técnica de regressão linear no nível de 95% de confiança (Tabela 6.2).

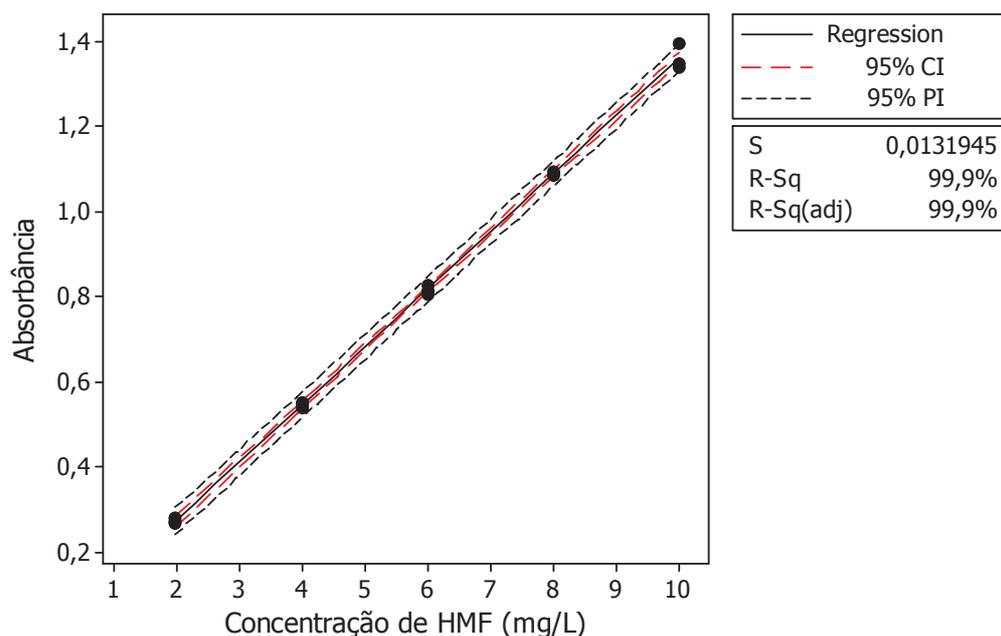
**Tabela 6.2.** Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança.

<b>Regressão*</b>		<b>Falta de ajuste**</b>		<b>r</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>F<sub>regressão</sub></b>	<b>valor de p</b>	<b>F<sub>faj</sub></b>	<b>valor de p</b>		
12732,73	0,000	0,04	0,987	0,9999	99,9 %
<b>Coefficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão</b>				<b>t<sub>observado***</sub></b>	<b>valor de p</b>
Intercepto : 0,00094 ± 0,00045				0,12	0,908
Inclinação: 0,1359 ± 0,0021				112,84	0,000

\*F<sub>crítico</sub> (0,05; 1, 13) = 4,667; \*\*F<sub>crítico</sub> (0,05; 3, 10) = 3,708; \*\*\*t<sub>crítico</sub> (0,025; 13) = 2,160

Para a análise dos resultados foi realizada uma análise de variância característica da regressão linear e foi aplicado um teste de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) para verificar se o modelo gerado era apropriado, ambos no nível de 95% de confiança (Tabela 6.2). Os resultados indicam que o modelo linear é adequado para estabelecer a relação entre a absorvância em 285 nm e a concentração de HMF, pois os valores para  $F_{faj}$  não foram significativos no nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ). Este fato é ressaltado também pelo valor do  $F_{regressão}$  altamente significativo ( $p = 0,000$ ) observado no mesmo nível de confiança (Tabela 6.2). Diante destes resultados, verificou-se a significância dos coeficientes da calibração (intercepto e inclinação) pela aplicação de um teste-t sobre cada coeficiente no mesmo nível de confiança (Tabela 6.2). A análise do teste-t indicou que somente a inclinação foi significativa ( $p = 0,000$ ), visto que o intercepto apresentou um valor de  $t_{calculado} < t_{crítico}$  ( $p = 0,908$ ) sendo, portanto, não significativo. Desta forma, pode-se sugerir que a curva de calibração é linear na faixa de concentrações estudada, passa pela origem e pode ser representada por: absorvância =  $0,00094 + 0,1359 \cdot$  concentração de HMF ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 6.6).

O modelo linear ajustado à curva analítica apresentou um coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9999 que está dentro dos limites recomendados ( $r > 0,99$ ) pela Anvisa (2003). Neste estudo foi obtido um valor para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 99,9% sugerindo que somente 0,1% da variação nos dados experimentais é explicada pelos resíduos (Tabela 6.2).



**Figura 6.6.** Reta da regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos de predição (IP) a 95% de confiança para a curva de calibração do método espectrofotométrico.

#### 6.2.2.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Para verificar se era possível determinar teores de HMF em amostras de xarope em baixas concentrações, os valores de LD e LQ foram determinados, utilizando-se o método da curva analítica por meio das Equações 5.1 e 5.2 descritas no item 5.2.2.4.3.

Neste trabalho, foram determinados valores de LD e LQ de  $0,10 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,34 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Na literatura existem vários estudos utilizando o método espectrofotométrico modificado de White (1979) para a determinação dos teores de HMF em mel. Todavia a maioria deles não realizou um estudo das características analíticas do método (TRUZZI et al., 2012; KHALIL et al., 2010).

Para a determinação espectrofotométrica de mel utilizando o método modificado de White (1979) tem sido relatados valores de LD e LQ de  $0,22 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,67 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente (TRUZZI et al., 2012). Apesar, de não terem sido encontrados trabalhos envolvendo o desenvolvimento e validação de métodos espectrofotométricos para xarope, os limites obtidos no presente estudo foram menores do que os observados para mel e portanto, foram considerados adequados.

### **6.2.2.3. Precisão**

Para verificar a confiabilidade do método espectrofotométrico proposto foi realizado o estudo de precisão. No estudo de precisão foram avaliadas a repetitividade, realizada no mesmo dia e a precisão intermediária, realizada em 05 dias diferentes. Além do fator tempo, para as estimativas de precisão intermediária foram avaliados também outros fatores como analistas e equipamentos. Os resultados obtidos para o estudo de precisão são apresentados na Tabela 6.3.

Aos dados do estudo de precisão foi aplicada uma ANOVA característica do planejamento hierárquico no nível de 95% de confiança e os resultados são apresentados na Tabela 6.4.

**Tabela 6.3.** Dados obtidos para o estudo de precisão.

Operador	Equipamento 1						Equipamento 2					
	Dia	C <sub>1</sub> *	C <sub>2</sub> *	C <sub>3</sub> *	C <sub>123</sub> **	C média***	Dia	C <sub>1</sub> *	C <sub>2</sub> *	C <sub>3</sub> *	C <sub>123</sub> **	C média***
1	1	1660,60	1661,72	1656,74	1659,69	1657,34	1	1660,66	1658,67	1653,71	1657,68	1659,27
	2	1663,52	1657,34	1660,64	1660,50		2	1668,80	1659,87	1663,58	1664,08	
	3	1666,78	1659,54	1655,58	1660,63		3	1659,94	1659,60	1662,51	1660,68	
	4	1648,43	1649,93	1657,74	1652,03		4	1647,22	1650,66	1654,04	1650,64	
	5	1648,60	1658,21	1654,70	1653,84		5	1664,36	1664,50	1660,99	1663,28	
2	1	1646,31	1658,69	1656,06	1653,69	1652,88	1	1648,70	1658,14	1658,61	1655,14	1657,24
	2	1651,92	1649,35	1654,25	1651,84		2	1668,07	1658,81	1660,37	1662,42	
	3	1654,28	1659,87	1649,64	1654,60		3	1657,48	1669,27	1648,52	1658,42	
	4	1656,74	1649,78	1647,44	1651,32		4	1647,49	1656,76	1656,89	1653,71	
	5	1656,55	1648,50	1653,80	1652,95		5	1650,80	1658,60	1660,13	1656,51	
Concentração Global****		1656,68										

\*C: réplica das concentrações de HMF (mg kg<sup>-1</sup>) obtidas na solução de xarope em cada dia

\*\*C<sub>123</sub>: Concentração média de HMF (mg kg<sup>-1</sup>) obtida a partir das réplicas em cada dia

\*\*\*C média: Concentração média de HMF (mg kg<sup>-1</sup>) obtida a partir da média dos 05 dias

\*\*\*\*Concentração Global: média das concentrações obtidas considerando operador, equipamento e dia (\*\*\*C média)

**Tabela 6.4.** ANOVA dos resultados do estudo de precisão.

Fonte de Variância	g.l.	SQ	QM	Quantidade Estimada	F observado	p
Equipamento (I)	1	148,7135	148,7135	$n_O n_T n_r s_I^2 + n_T n_r s_O^2 + n_r s_T^2 + s_r^2$	1,651*	0,327
Analista (O)	2	180,1080	90,0540	$n_T n_r s_O^2 + n_r s_T^2 + s_r^2$	2,021**	0,165
Dia (T)	16	713,0861	44,5679	$n_r s_T^2 + s_r^2$	1,850***	0,058
Resíduo (r)	40	963,5784	24,0895	$s_r^2$		
Total	59	2005,4860				

n<sub>r</sub> : número de réplicas; n<sub>T</sub> : número de dias; n<sub>A</sub> : número de analistas;

\*F crítico (0,05; 1, 2) = 18,513; \*\*F crítico (0,05; 2, 16) = 3,634; \*\*\*F crítico (0,05; 16, 40) = 1,904

Como observado na Tabela 6.3, por meio dos valores obtidos para concentração de HMF em xarope considerando-se analistas, equipamentos e dias diferentes foi possível obter a concentração global de HMF na amostra, sendo 1656,68 mg kg<sup>-1</sup>. Os valores de  $F_{observado}$ , apresentados na Tabela 6.4, para equipamento (1,651), analista (2,021) e dia (1,850), foram menores que o  $F_{critico}$  para cada uma destas fontes de variância. Isso sugere que estes fatores não contribuem de forma significativa para a precisão do método espectrofotométrico. Assim, não existem diferenças significativas entre os diferentes equipamentos, analistas e dias. Este fato pode ser comprovado, pelos valores de  $p$  obtidos ( $p > 0,05$ ). A partir dos resultados da ANOVA foram calculados os componentes de variância. As equações utilizadas para obter cada um dos componentes de variância e suas estimativas são apresentadas na Tabela 6.5.

**Tabela 6.5.** Componentes de Variância, equações e suas estimativas para precisão intralaboratorial.

<b>Componentes de Variância</b>	<b>Equações</b>	<b><math>s^2</math></b>	<b><math>s</math></b>	<b><math>s^2(\%)</math></b>
Réplica (r)	$s_r^2 = QM_r$	24,089	4,908	67,10
Dia (T)	$s_T^2 = \frac{QM_T - QM_r}{n_r}$	6,826	2,613	19,01
Analista (O)	$s = \frac{QM_O - QM_T}{n_T n_r}$	3,032	1,741	8,45
Equipamento (I)	$s_I^2 = \frac{QM_I - QM_O}{n_O n_T n_r}$	1,955	1,398	5,45
Variância total para (O+I+T) diferentes	$s_{IP(OIT)}^2 = s_O^2 + s_I^2 + s_T^2 + s_r^2$	35,903	5,992	-

Como é possível observar na Tabela 6.5, os maiores valores de variância (%) obtidos são para réplica (67,10%) e dia (19,01%), sugerindo que estes componentes são os que mais contribuem para a variância nos resultados e por assim dizer, na precisão do método espectrofotométrico.

A partir da variância das réplicas ( $s_r^2$ ) e da variância total para (analistas + equipamentos + dias) diferentes ( $s_{IP(OIT)}^2$ ), apresentados na Tabela 6.5 foi possível determinar os valores de RSD (%) e valor Horrat para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente, utilizando-se as Equações 5.3 e 5.4, apresentadas no item 5.2.2.4.4. Os resultados para a precisão são representados na Tabela 6.6.

**Tabela 6.6.** Precisão (repetitividade e precisão intermediária) e valor Horrat.

Amostra	RSD (%)		Valor Horrat
	Repetitividade	Precisão intermediária	
Xarope	0,296	0,362	0,07

Como mostra a Tabela 6.6, os valores obtidos para a precisão no mesmo dia (repetitividade) e precisão entre dias, analistas e instrumentos diferentes (precisão intermediária) foram adequados. De acordo com a AOAC (2012) valores de RSD (%) < 3,7 são recomendados para estimativas de repetitividade na faixa de concentração investigada. Como observado, a estimativa de repetitividade obtida foi bem menor do que este limite aceitável. Para avaliar a adequabilidade da estimativa de precisão intermediária foi calculado também o valor Horrat, o qual foi também muito menor do que o limite aceito para a precisão de análises intralaboratorias (< 1,3) (GONZÁLES et al., 2010). Os resultados indicam que o método espectrofotométrico apresenta uma boa precisão.

#### 6.2.2.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da comparação dos teores de HMF (mg kg<sup>-1</sup>) obtidos pelo método espectrofotométrico proposto com os valores obtidos pelo método de CLAE-UV por dois testes estatísticos: teste-*t* pareado e análise de regressão linear, ambos no nível de 95% de confiança. Os resultados são apresentados nas Tabelas 6.7 e 6.8.

**Tabela 6.7** Teores de HMF de amostras de xarope determinados pelos métodos de CLAE-UV e espectrofotométrico e teste-*t* pareado.

Amostras	Teor de HMF (mg.kg <sup>-1</sup> )		Recuperação (%)	Teste- <i>t</i> pareado*	<i>P</i>
	CLAE-UV	Espectrofotométrico Direto			
X1	1655,9 ± 7,1	1654,6 ± 5,1	99,9	0,01	0,998
X2	1086,9 ± 3,6	1087,4 ± 1,8	100,0		
X3	1627,9 ± 3,4	1623,7 ± 2,9	99,8		
X4	50,4 ± 0,6	46,6 ± 0,7	93,3		
X5	<LD	<LD	-		
X6	2121,3 ± 2,5	2114,4 ± 4,2	99,7		
X7	406,6 ± 2,3	397,1 ± 4,2	97,7		
X8	1642,6 ± 5,1	1635,9 ± 6,2	99,6		

\**t*<sub>crítico</sub> (0,025; 7) = 2,78

Para as diferentes amostras de xarope, pelos dois métodos analíticos foi observado um amplo intervalo de concentração para o HMF, entre <LD a 2121,3 mg kg<sup>-1</sup> para o método de CLAE-UV e <LD a 2114,4 mg kg<sup>-1</sup> para o método espectrofotométrico (Tabela 6.7). Diante disso, torna-se possível verificar que os valores obtidos para ambos os métodos são concordantes, embora o método espectrofotométrico apresente uma sensibilidade menor que o método de CLAE-UV. A comparação do método espectrofotométrico com o método de CLAE-UV permitiu também o cálculo de taxas de recuperação para o método espectrofotométrico, como visto na Tabela 6.7 para as diferentes amostras de xarope. Foram observados valores de recuperação superiores a 99% para todas as amostras, com exceção das amostras X4 (93,3%) e X7 (97,7%). Estes resultados podem ser justificados, considerando-se que na literatura já foi reportado que o método espectrofotométrico modificado de White (1979) não apresenta boa sensibilidade para determinação deste contaminante em amostras com concentrações baixas de HMF (< 15 mg kg<sup>-1</sup>) (TRUZZI et al., 2012). Isso pode estar relacionado também com a robustez do equipamento, visto também que o método de CLAE-UV é um método muito mais seletivo que o método espectrofotométrico, sendo este último mais suscetível à presença de interferentes (LEMOS et al., 2010; SHIBAO, 2010). Apesar disso, os limites recomendados pela AOAC (2012) para as taxas de recuperação na faixa de concentrações da amostra X4 são de 80-110% e para a faixa de concentrações da amostra X7 são de 90 – 107%, sugerindo que o método espectrofotométrico apresenta exatidão adequada também em baixas concentrações.

A análise do teste-*t* pareado sugeriu que não existem diferenças significativas nos teores de HMF determinados pelo método espectrofotométrico em relação aos obtidos pelo método de CLAE-UV, pois o valor de  $t_{observado} = 0,01$  foi menor do que o  $t_{critico} = 2,78$  ( $p > 0,05$ ). Isto indica que o método espectrofotométrico proposto apresenta exatidão adequada em relação ao método cromatográfico para a determinação de HMF em amostras de xarope.

A exatidão do método espectrofotométrico foi avaliada também pela técnica de regressão linear aplicada aos resultados apresentados na Tabela 6.7 no nível de 95% de confiança (Tabela 6.8). Esta técnica permite identificar a presença de erros aleatórios e sistemáticos, os quais podem afetar a exatidão de ambos os métodos.

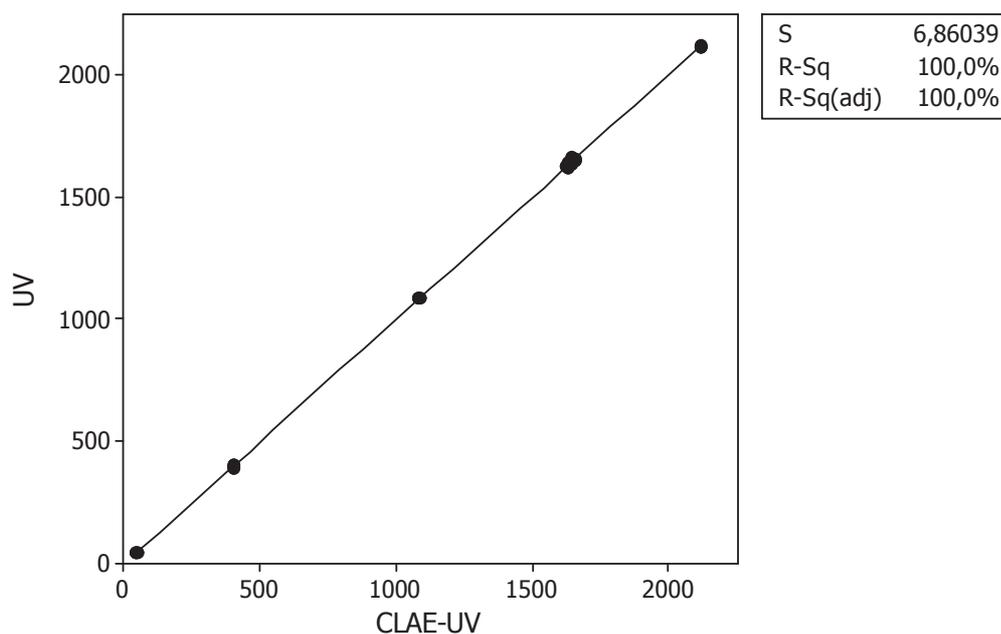
**Tabela 6.8.** Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança.

<i>Regressão*</i>		<i>r</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
<i>F</i> regressão	valor de <i>p</i>	1,00	100,00 %
216423,53	0,000		
Coeficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão		<i>t</i> observado**	valor de <i>p</i>
Intercepto : -4,651		-1,53	0,142
Inclinação: 1,000		465,21	0,000

\* $F_{\text{crítico}}(0,05; 1, 19) = 4,381$ ; \*\* $t_{\text{crítico}}(0,025; 19) = 2,093$

O modelo linear ajustado aos resultados apresentou um valor de coeficiente de correlação ( $r$ ) concordante com o limite ressaltado pela literatura ( $r > 0,99$ ), segundo a Anvisa (2003), sugerindo que o modelo apresenta uma possível linearidade. O coeficiente de determinação  $R^2$  (100,00%), apresentado na Tabela 6.8 mostrou que os resíduos não influenciam na variação observada nos resultados. Isso indica que os teores de HMF obtidos pelo método espectrofotométrico correspondem linearmente aos teores de HMF apresentados pelo método de CLAE-UV. Visando a confirmação desta hipótese, aos dados foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) característica da regressão linear a 95% de confiança.

Os resultados mostram que o modelo linear é adequado, e os teores de HMF apresentam uma correlação linear entre ambos os métodos, fato este que pode ser observado pelo valor de  $F_{\text{regressão}}$  altamente significativo ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6.8). Aos dados foi aplicado ainda um teste- $t$  de modo a verificar a significância dos coeficientes da regressão linear (intercepto e inclinação), no mesmo nível de confiança. Esta análise indicou que a inclinação (1,000) é significativa ( $p = 0,000$ ), enquanto que o intercepto não é, pois foi obtido um valor de  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$  ( $p = 0,142$ ) para este coeficiente. Estes resultados indicam que ambos os métodos não são afetados de forma significativa por erros sistemáticos. Dessa forma, é possível sugerir que o método espectrofotométrico apresenta boa exatidão para determinação de HMF em amostras de xarope e o método de referência não é afetado de forma significativa por erros aleatórios e sistemáticos (Figura 6.8).



**Figura 6.7.** Retas da regressão linear entre os métodos de CLAE-UV e espectrofotométrico

Em vista dos resultados obtidos pode-se sugerir que o método espectrofotométrico apresenta boa exatidão para a determinação de HMF em amostras de xarope.

### 6.3. Conclusões parciais

O presente estudo permitiu verificar que é possível quantificar o teor de HMF em amostras de xarope em uma ampla faixa de concentração pelo método espectrofotométrico proposto neste trabalho. Os estudos de otimização e validação intralaboratorial sugeriram que o método espectrofotométrico apresenta boa linearidade e sensibilidade, bem como exatidão e precisão adequadas para a análise deste contaminante em xarope. Além disso, pode-se sugerir que o método espectrofotométrico por ser de baixo custo, de fácil execução e não necessitar de preparo de amostra possa ser adotado em laboratórios de controle de qualidade e por órgão regulamentadores.

### 6.4. Referências

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em: maio, 2013.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th Edition. 2012. APÊNDICE F.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and evaluation. *Journal of Chromatography B*. v. 877. p. 2224-2234. 2009.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE008 – Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 04, julho/2011.

BOGDANOV, S. Harmonised Methods of the International Honey Commission. *Apidologie, Sp. Iss.* p. 1-59. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação de produtos apícolas e derivados. Instrução Normativa n.11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de Identidade de Qualidade do Mel. 2000.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. *Talanta*. v. 82. p. 1995–1998. 2010.

KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and Chemical Toxicology*. v. 48. p. 2388–2392. 2010.

KUTTATHARMMAKUL, S.; MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Comparison of alternative measurement methods. *Analytica Chimica Acta*. v. 391. p. 203-225. 1999.

LEMOES, G. da S.; SANTOS, J. S. dos; SANTOS, M. L. P. dos; Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. *Química Nova*. v. 33. n. 8. p. 1682-1685. 2010.

MITRA, S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003. v. 162.

NATA. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. 2012.

SILVA, S. J. N. da; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEIN, M. H.; JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 28. p. 46-50. 2008.

SHIBAO, J. Avaliação do teor de Produtos da Reação de Maillard (PRM) em cereais matinais e café. 2010. 101f. Dissertação. (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

TRUZZI, C.; ANNIBALDI, A.; ILLUMINATI, S.; FINALE, C.; ROSSETTI, M.; SCARPONI, G. Determination of Very Low Levels of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) in Natural Honey: Comparison Between the HPLC Technique and the Spectrophotometric White Method. *Journal of Food Science*. v. 77. p. 784-790. 2012.

WHITE, J. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. v.62. p.509-514. 1979.

**CAPÍTULO 7. CORRELAÇÃO DO HMF COM A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE  
MEL, DE XAROPE E DE MELAÇO DE CANA**

## **CAPÍTULO 7. CORRELAÇÃO DO HMF COM A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MEL, DE XAROPE E DE MELAÇO DE CANA**

Na literatura, tem sido reportado que o HMF é um contaminante formado espontaneamente em alimentos ricos em carboidratos pela reação de Maillard (reação de escurecimento não enzimático) ou por desidratação de açúcares na forma de hexoses catalisada por ácidos (BELITZ et al., 2009; KHALIL et al., 2010; TOKER et al., 2013). Sabe-se que este contaminante é praticamente ausente em alimentos frescos e que não sofreram processamento térmico. Seus níveis elevam-se quando o alimento é submetido a processamentos térmicos severos ou longos períodos de estocagem (ASKAR, 1984; BATH e SINGH, 1999; FALLICO et al, 2004; KHALIL et al., 2010). De modo geral, a formação de HMF em alimentos com altos teores de carboidratos está relacionada a concentrações elevadas de açúcares redutores, baixos valores de pH, aplicação de altas temperaturas durante o processamento ou estocagem e longos tempos de armazenagem (BELITZ et al., 2009).

Com relação aos alimentos investigados neste trabalho tem sido descrito que a velocidade de formação de HMF em mel durante a estocagem pode ser afetada pelo uso de recipientes metálicos, pelas características químicas (pH, açúcares redutores, acidez total e conteúdo mineral) relacionadas a origem botânica do mesmo e tipo de exposição térmica e fotoquímica (SPANNO et al, 2006; KHALIL et al., 2010). Para melaço de cana por sua vez, a formação de HMF é dependente da temperatura aplicada no processamento, tipo de açúcar, valores de pH, atividade de água e concentração de cátions divalentes presentes no meio (TOKER et al., 2013). Todavia, não foram encontrados estudos desse tipo para amostras de mel e melaço de cana provenientes do Brasil e Canadá, as quais podem apresentar diferenças na composição química e especialmente na temperatura do processamento e tempo de estocagem. Já para o xarope devido à escassez de trabalhos na literatura relacionados à determinação de HMF nesta matriz, não foram encontradas referências que apresentassem os fatores que influenciam na formação deste contaminante. Outro aspecto a ser salientado é que os estudos descritos na literatura têm sido realizados de forma univariada. Sendo assim, no presente trabalho foi realizado um estudo de correlação entre os teores de HMF encontrados com a composição química das amostras de mel, de xarope e de melaço de cana pela aplicação da Análise de Componentes Principais.

A Análise de Componentes Principais (ACP) é uma ferramenta quimiométrica que transforma os dados multivariados em novas variáveis ortogonais, maximizando assim, suas

variâncias. Dessa forma, os dados transformados estão projetados em duas ou três dimensões para facilitar o reconhecimento de tendências sistemáticas. Os dados experimentais são projetados dentro de coordenadas 2D ou 3D, que correspondem aos gráficos de escores, mostrando a relação entre esses valores experimentais. Os grupos de valores que são formados no gráfico de escores podem ser usados na classificação/separação de amostras com dados similares (WEI et al., 2010). Dessa forma, por meio da ACP busca-se simplificar ou facilitar a interpretação dos fatores estudados, pela construção de variáveis alternativas que sintetizem a informação original dos dados. Além disso, permite agrupar elementos que apresentam similaridade entre si e analisar as relações entre as variáveis que estão associadas ao fator estudado (MINGOTI, 2005; PELLERANO et al., 2012).

## **7.1. Materiais e Métodos**

### **7.1.1. Análises Físico-Químicas**

Para as amostras investigadas neste estudo e descritas no capítulo 4 foi avaliada também a composição físico-química através da análise dos parâmetros açúcares redutores, umidade, pH, acidez, condutividade elétrica e também pelo grau de escurecimento não enzimático. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Traços e Instrumentação (LabGati) da Unicentro.

#### **7.1.1.1. Açúcares redutores**

A determinação de açúcares redutores nas amostras foi realizada de acordo com o método 177/IV dos Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (ZENEBO e PASCUET, 2008). As análises foram realizadas em duplicata.

#### **7.1.1.2. Umidade**

A determinação do teor de umidade (%) para as amostras de mel foi realizada pelo método refratométrico por meio da conversão dos valores de índice de refração em porcentagem de umidade. As medidas foram obtidas em um refratômetro de Abbé a 20°C segundo o método 173/IV dos Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos

(ZENEBO e PASCUET, 2008). A análise do teor de umidade (%) para as amostras de xarope e de meloço de cana foi realizada através da titulação volumétrica de Karl Fischer, com titulador Q349-1 da Quimis, utilizando reagente de Karl Fischer sem piridina (Biotec) e metanol anidro (JT Baker, EUA), segundo o método 014/IV dos Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (ZENEBO e PASCUET, 2008). As análises foram realizadas em triplicata.

#### **7.1.1.3. pH**

A análise de pH foi realizada em um pHmetro modelo pH.21 da marca Hanna de acordo com o método 017/IV dos Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (ZENEBO e PASCUET, 2008). Foram preparadas soluções de 50,0 mg mL<sup>-1</sup> de cada amostra (mel, xarope e meloço de cana), para posterior leitura do pH. As análises foram realizadas em duplicata.

#### **7.1.1.4. Grau de escurecimento não enzimático**

Os valores de absorvância a 420 nm são normalmente adotados como uma medida do grau de escurecimento não enzimático ou da extensão da reação de Maillard (LIENOVEN et al., 2002). Para a análise foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis, marca Spectrun Meter, modelo SP-2000UV e cubeta de vidro de 10,0 mm de caminho óptico. A análise baseou-se no método de Almeida e Benassi (2011), com modificações na massa da amostra e adição de clarificante. Foi preparada uma solução de mel e xarope 10,0 % (m/v) e de meloço de cana 0,5 % (m/v). A diluição foi adotada para reduzir o espalhamento da luz devido aos agregados de proteínas. A determinação da absorvância da solução de xarope de glicose foi realizada em um comprimento de onda de 420 nm. Para as amostras de mel e de meloço de cana, que contém naturalmente maior teor de proteínas foi adicionado também um clarificante, sendo 0,5 mL de solução de Carrez I e 0,5 mL de solução de Carrez II. Em seguida as soluções de mel e de meloço de cana foram centrifugadas durante 10 minutos, para posterior determinação da absorvância do sobrenadante em 420 nm. As medidas foram realizadas em duplicata no Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação (LabGati) da Unicentro.

#### 7.1.1.5. Acidez

Para a determinação da acidez das amostras de mel, de xarope e de melaço de cana foi utilizado um pHmetro modelo pH.21 da marca Hanna de acordo com o método 253/IV dos Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (ZENEBO e PASCUET, 2008). Foi preparada uma solução de cada uma das amostras em duplicata, pela diluição de 10,0 g da amostra com 90,0 mL de água destilada. Posteriormente, a solução da amostra foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L<sup>-1</sup>, até obtenção de pH próximo de 8,0. Os resultados foram calculados por meio da Equação 7.1.

$$Acidez = \frac{V \times f \times M \times 100}{A} \quad (\text{Equação 7.1})$$

em que :

V= volume gasto de hidróxido de sódio 0,1 M

f= fator de correção do hidróxido de sódio 0,1 M

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio 0,1 M

A = volume da amostra em mL ou massa em g

#### 7.1.1.6. Condutividade Elétrica

A medida da condutividade elétrica das amostras de mel, de xarope e de melaço de cana foi realizada utilizando-se um condutivímetro Conductivity Meter, da marca Lutron, modelo CD-4301. Inicialmente foi realizada a padronização do condutivímetro com solução padrão de condutividade 14,12 μS cm<sup>-1</sup>. Foi realizada a leitura da condutividade da água ultrapura, a qual deve ser menor que 2,0 μS cm<sup>-1</sup>. Em seguida, pesou-se 5,0 g de cada amostra e adicionou-se 95,0 mL de água ultrapura. Posteriormente, realizou-se a leitura da condutividade elétrica. As leituras de condutividade elétrica foram automaticamente corrigidas pelo condutivímetro com relação à temperatura. As análises foram realizadas em duplicata.

#### 7.1.2. Análise de HMF

Os teores de HMF foram obtidos em triplicata pelo método validado de CLAE-UV descrito no Capítulo 5.

### 7.1.3. Análise Estatística

Para avaliar a influência da composição química de mel, de xarope e de melaço de cana nos teores de HMF foi aplicada uma Análise de Componentes Principais (ACP). A ACP foi realizada através da determinação da distância entre os dados das amostras que foram calculados considerando-se as médias dos parâmetros físico-químicos. Toda a análise estatística foi realizada usando o software MATLAB (Matlab & Simulink-R2006a, OPENCADD ADVANCED TECHNOLOGY, São Paulo, Brazil).

## 7.2. Resultados e Discussão

No Capítulo 5, no item 5.4 em que foi descrita a aplicação do método de CLAE-UV validado foram observadas diferenças significativas nos teores de HMF entre amostras de mel, entre amostras de xarope e entre amostras de melaço de cana. Para melhor explicar este comportamento foram determinados fatores relacionados à reação de formação do HMF como a composição química das amostras (açúcares redutores, pH, umidade, condutividade elétrica e acidez) bem como o grau de escurecimento não enzimático medido a 420 nm e idade estimada que está relacionada com o tempo de estocagem. A idade estimada foi determinada considerando-se a data de fabricação e a data de realização das análises. Os resultados da análise da composição química são apresentados na Tabela 7.1 como médias, desvios padrão e intervalos de variação.

A Tabela 7.1 apresenta a informação referente ao tempo de estocagem das amostras coletadas no Brasil e no Canadá. Para as amostras M5, M6 e M9, provenientes do Canadá, não foi possível determinar a idade estimada das mesmas, pois, os fabricantes não declararam no rótulo informações sobre a data de fabricação.

**Tabela 7.1.** Teores de HMF e dados de composição química das amostras de mel, xarope e melaço de cana.

ID <sup>1</sup>	Teor de HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Açúcares redutores (%)	Umidade (%)	pH	Absorbância 420nm <sup>2</sup>	Condutividade	Acidez	Idade Estimada <sup>3</sup>
M1	13,12 ± 0,09	72,45 ± 0,01	17,30 ± 0,00	3,72 ± 0,02	0,090 ± 0,001	0,205 ± 0,001	35,16 ± 0,37	5 meses
M2	5,88 ± 0,13	73,50 ± 0,01	16,95 ± 0,00	3,96 ± 0,00	0,087 ± 0,002	0,181 ± 0,000	22,58 ± 0,34	1 mês
M3	84,39 ± 0,70	72,44 ± 0,01	17,20 ± 0,00	3,67 ± 0,01	0,123 ± 0,001	0,187 ± 0,001	32,03 ± 0,01	9 meses
M4	36,44 ± 0,39	67,50 ± 0,06	20,15 ± 0,00	3,32 ± 0,01	0,039 ± 0,002	0,076 ± 0,000	17,49 ± 0,00	25 meses
M5	21,56 ± 0,23	70,40 ± 0,01	17,65 ± 0,00	3,47 ± 0,00	0,028 ± 0,001	0,069 ± 0,000	11,65 ± 0,00	Não informado
M6	11,59 ± 0,64	67,34 ± 0,02	16,50 ± 0,00	3,52 ± 0,00	0,054 ± 0,017	0,068 ± 0,000	11,17 ± 0,00	Não informado
M7	41,64 ± 2,56	71,42 ± 0,00	16,10 ± 0,00	3,50 ± 0,01	0,033 ± 0,000	0,061 ± 0,001	11,40 ± 0,34	1 mês
M8	49,75 ± 2,97	74,60 ± 0,01	16,50 ± 0,00	3,75 ± 0,00	0,129 ± 0,010	0,121 ± 0,001	18,68 ± 0,34	1 mês
M9	12,98 ± 0,55	68,48 ± 0,01	17,15 ± 0,00	3,50 ± 0,00	0,024 ± 0,002	0,059 ± 0,000	10,92 ± 0,34	Não informado
Intervalo de Variação	5,88 - 84,39	67,34 - 74,60	16,10 - 20,15	3,32 - 3,96	0,024 - 0,129	0,059 - 0,205	10,92 - 35,16	-
X1	1655,88 ± 7,14	60,74 ± 0,25	15,21 ± 0,08	4,35 ± 0,02	0,194 ± 0,002	0,244 ± 0,000	3,88 ± 0,00	44 meses
X2	1086,90 ± 3,57	59,45 ± 0,21	19,46 ± 0,03	4,37 ± 0,00	0,210 ± 0,001	0,176 ± 0,000	5,34 ± 0,00	42 meses
X3	1627,95 ± 3,45	64,72 ± 0,16	15,22 ± 0,05	2,65 ± 0,02	0,140 ± 0,001	0,305 ± 0,001	45,02 ± 0,74	41 meses
X4	50,37 ± 0,59	40,32 ± 0,00	20,59 ± 0,03	5,00 ± 0,01	0,090 ± 0,002	0,258 ± 0,001	1,45 ± 0,00	5 meses
X5	ND*	ND*	32,24 ± 0,07	5,89 ± 0,01	0,012 ± 0,000	0,110 ± 0,000	2,89 ± 0,00	12 meses
X6	2121,29 ± 2,47	62,37 ± 0,19	17,65 ± 0,16	4,46 ± 0,00	0,190 ± 0,000	0,240 ± 0,001	3,91 ± 0,01	14 meses
X7	406,60 ± 2,26	57,24 ± 0,17	18,10 ± 0,18	4,84 ± 0,00	0,208 ± 0,001	0,173 ± 0,001	5,41 ± 0,01	15 meses
X8	1642,55 ± 5,14	65,12 ± 0,12	12,13 ± 0,51	3,27 ± 0,00	0,149 ± 0,001	0,313 ± 0,001	45,34 ± 0,69	18 meses
Intervalo de Variação	ND* - 2121,29	ND* - 65,12	12,13 - 32,24	2,65 - 5,89	0,012 - 0,210	0,110 - 0,313	1,45 - 45,34	-
MC1	536,43 ± 2,01	66,61 ± 0,01	20,52 ± 0,08	4,56 ± 0,01	1,420 ± 0,001	0,888 ± 0,001	52,35 ± 1,96	12 meses
MC2	115,07 ± 0,08	33,56 ± 0,23	18,60 ± 0,04	4,06 ± 0,01	0,205 ± 0,001	0,329 ± 0,001	41,19 ± 0,13	13 meses
MC3	893,14 ± 5,47	54,44 ± 0,02	14,01 ± 0,06	3,65 ± 0,00	0,325 ± 0,005	0,293 ± 0,001	60,45 ± 0,35	12 meses
MC4	109,25 ± 1,03	33,33 ± 0,01	17,41 ± 0,02	5,28 ± 0,01	0,955 ± 0,001	0,584 ± 0,001	35,70 ± 0,34	6 meses
MC5	593,31 ± 0,48	45,67 ± 0,00	16,73 ± 0,06	4,29 ± 0,02	0,920 ± 0,001	0,812 ± 0,003	80,10 ± 1,36	1 mês
MC6	20,90 ± 2,27	40,64 ± 0,01	18,83 ± 0,09	5,34 ± 0,00	3,125 ± 0,007	1,357 ± 0,002	61,48 ± 0,17	8 meses
MC7	460,87 ± 2,42	64,21 ± 0,01	18,47 ± 0,26	4,78 ± 0,01	1,418 ± 0,001	0,891 ± 0,000	52,65 ± 1,02	1 mês
Intervalo de Variação	20,90 - 893,14	33,33 - 66,61	14,01 - 20,52	3,65 - 5,34	0,205 - 3,125	0,293 - 1,357	41,19 - 80,10	-

<sup>1</sup> ID = Identificação das amostras em que as letras correspondem a identificação do alimento (M = mel; X = xarope; MC = melaço de cana) e os números as amostras; <sup>2</sup> medida do grau de escurecimento causado pela reação de Maillard ou desidratação das hexoses catalisada por ácido; <sup>3</sup> Intervalo de tempo estimado entre a data de fabricação e a data de realização das análises \*ND = não detectado.

Em estudos da literatura reporta-se que o tempo de estocagem é um fator que apresenta influencia na formação de HMF em amostras de mel e de melaços de frutas, sendo que os maiores teores deste contaminante estão relacionados ao maior tempo de estocagem das amostras (TOKER et al., 2013; LEMOS et al., 2010). No entanto, observando-se a idade estimada das amostras analisadas (Tabela 7.1), verifica-se que no presente trabalho o tempo de estocagem não foi um fator importante para a formação deste contaminante nas amostras dos alimentos investigados. Portanto, este parâmetro não foi utilizado para explicar os níveis de HMF obtidos para estas amostras. Isso sugere também que a composição química e o processamento térmico aplicado apresentam maior influência para a formação deste contaminante nestas matrizes (SPANO et al., 2006; KHALIL et al., 2010; TRUZZI et al., 2012).

Visto o grande número de variáveis avaliadas para as amostras de mel, de xarope e de melaço de cana foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP) de modo a verificar quais fatores são importantes para a formação de HMF e que poderiam explicar as variações no teor deste contaminante para cada alimento investigado.

No presente trabalho, a ACP foi aplicada aos dados experimentais dos teores de HMF, açúcares redutores, umidade, pH, grau de escurecimento não enzimático, condutividade elétrica e acidez, nas amostras de mel, de xarope e de melaço de cana descritas no Capítulo 4. Por meio da ACP buscou-se verificar as possíveis semelhanças e/ou diferenças entre as mesmas, sua correlação entre as variáveis, bem como verificar quais parâmetros físico-químicos eram importantes para explicar os teores de HMF obtidos nas amostras analisadas. Os dados originais foram autoescalados e utilizados para gerar o modelo de regressão multivariada, de forma a manter a quantidade máxima de variabilidade presente nos dados.

### **7.2.1. Análise de Componentes Principais de Mel**

Inicialmente foi realizada uma ACP, com as variáveis HMF, açúcares redutores, umidade, grau de escurecimento não enzimático, acidez, pH e condutividade elétrica. No entanto, foi observado que os fatores pH e condutividade elétrica não apresentaram forte correlação com o HMF em nenhum dos CPs obtidos. Diante disso, foi realizada uma redução de variáveis do modelo e a ACP para o mel foi realizada para o teor de HMF, açúcares redutores, umidade, grau de escurecimento não enzimático e acidez. Entre os componentes principais a 1ª e 2ª CP foram responsáveis por explicar 77,30% de toda a variância nos dados,

considerando que a 1ª componente explicou 53,61% das relações existentes entre as amostras considerando as variáveis estudadas e a 2ª componente explicou 23,69%.

Os resultados da ACP são apresentados como escores. Estes caracterizam os principais padrões de concentrações no conjunto de dados que são analisados e sua variância explicada. A obtenção de escores positivos e negativos elevados permite verificar quais variáveis são importantes para o CP que está sendo avaliado. Os resultados para os escores das variáveis referentes aos fatores 1 (CP1) e 2 (CP2) e as correlações, estão apresentadas na Tabela 7.2.

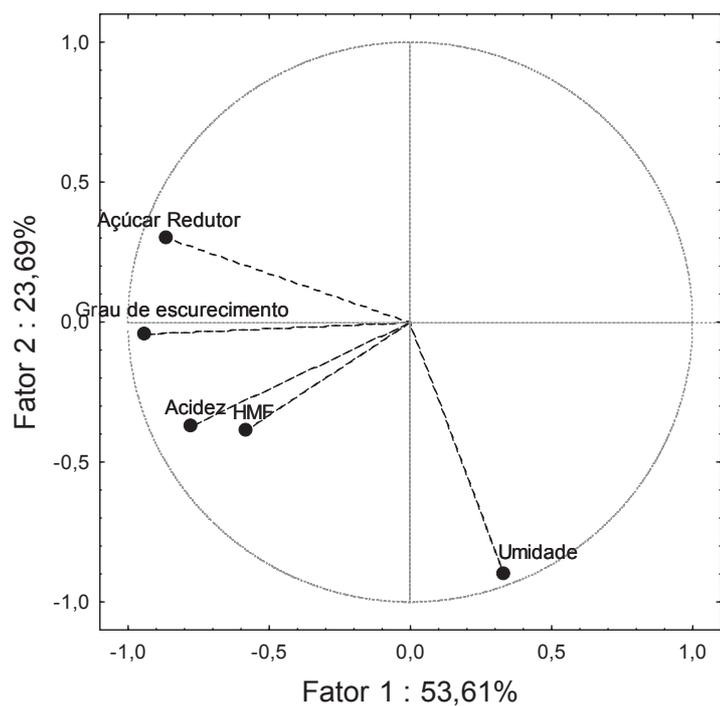
**Tabela 7.2.** Escores das variáveis HMF, açúcar redutor, umidade, grau de escurecimento não enzimático e acidez para as amostras de mel.

Variáveis	CP1	CP2
HMF	-0,579396	-0,386320
Açúcar redutor	-0,864907	0,298065
Umidade	0,329509	-0,897556
Grau de escurecimento não enzimático	-0,942651	-0,043646
Acidez	-0,774465	-0,372613

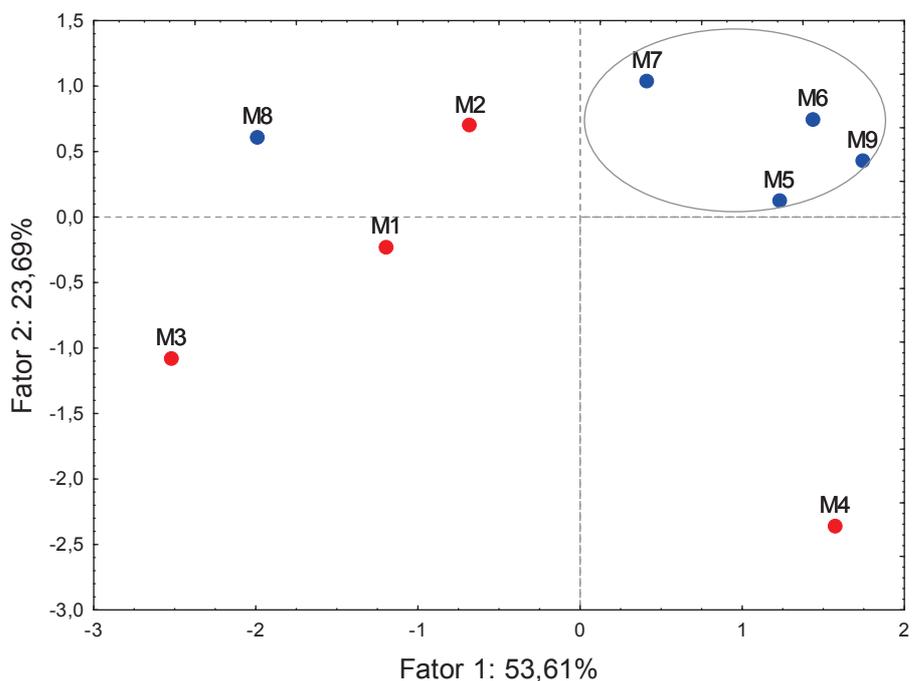
Como pode ser observado na Tabela 7.2, o primeiro componente (CP1) mostra que o HMF está diretamente correlacionado com açúcares redutores, grau de escurecimento não enzimático e acidez. A umidade apresentou um valor de escore positivo baixo no CP1, não sugerindo correlação significativa com HMF e os demais fatores. Já na CP2 é possível verificar que nenhum dos fatores mostrou forte correlação com o HMF.

De acordo com a literatura, os teores de HMF se elevam em amostras de mel que apresentam altos teores de açúcares e acidez (KHALIL et al., 2010). Considera-se ainda que a formação deste contaminante esteja relacionada a uma maior absorvância em 420 nm, que é um indicativo do grau de escurecimento não enzimático da amostra, principalmente pela aplicação de tratamento térmico (FALLICO et al., 2004; ALMEIDA e BENASSI, 2011). Isso sugere uma maior influência na formação do HMF da composição química das amostras de mel e do processamento térmico aplicado.

As Figuras 7.2 e 7.3 apresentam o gráfico de pesos e o gráfico de escores, respectivamente, para as duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2), para as 09 amostras de mel e os 05 componentes estudados.



**Figura 7.2.** Gráfico de pesos para a CP1 e CP2 obtidas com a análise multivariada dos dados para mel



**Figura 7.3.** Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos méis provenientes: do ● Brasil e do ● Canadá

Avaliando-se as amostras apresentadas na Figura 7.3, é possível verificar que a variabilidade das amostras foi explicada principalmente pela CP1 com 53,61%. Observa-se que todas as amostras de mel provenientes do Canadá com exceção da amostra M8 (Figura

7.3) estão agrupadas no quadrante positivo de X e positivo de Y. Em comparação com o gráfico de pesos (Figura 7.2), verifica-se que estas amostras não apresentam correlação significativa com nenhum dos fatores apresentados. Nota-se que as amostras de mel canadenses apresentaram teores menores de HMF e de todas as outras variáveis e suas características físico-químicas são semelhantes entre si. A amostra M4 que se encontra no quadrante positivo de X e negativo de Y (Figura 7.3), não se agrupa com as demais amostras, e como observado na CP1 (Figura 7.2), apresenta maior teor de umidade e baixos valores de açúcares redutores, grau de escurecimento não enzimático, acidez e de HMF. A amostra M4 é uma amostra proveniente do Vale do Ribeira em São Paulo, uma região de floresta, característica pela presença de méis silvestres (LIANDA, 2009). Os méis apresentam em sua composição compostos fenólicos e flavonóides, que atuam como antioxidantes (LIANDA, 2009). Segundo Bogdanov et al. (2004) amostras de mel de coloração clara apresentam um teor maior de flavonóides, e amostras com coloração mais escura apresentam maiores teores de compostos fenólicos. Considera-se que a atividade antioxidante dos méis tem sido relatada como eficaz contra as reações de escurecimento neste alimento (LIANDA, 2009). Diante disso, sugere-se que o baixo teor de HMF presente nesta amostra (M4) possa estar relacionado à maior ação antioxidante da mesma, pela presença de compostos fenólicos e flavonoides, que inibem a extensão da reação de Maillard.

As amostras M1, M2 e M3 oriundas do Brasil e a amostra M8 proveniente do Canadá encontram-se do lado esquerdo da CP1 (Figura 7.3). Estas amostras são influenciadas pelos teores relativamente altos de açúcares redutores, grau de escurecimento não enzimático e acidez, que são fatores que podem afetar os teores de HMF (SPANNO et al, 2006; KHALIL et al., 2010). Nota-se que o teor de HMF da amostra M3 (quadrante negativo de X e negativo de Y), na Figura 7.3 se comparado com o gráfico de pesos (Figura 7.2), justifica-se pela acidez e grau de escurecimento não enzimático. Como já descrito anteriormente, a medida da absorbância a 420 nm tem sido usada como uma estimativa do grau de escurecimento não enzimático ou da extensão da reação de Maillard para alimentos como café e bebidas como vinho (SERRA-CAYUELA et al., 2013, ALMEIDA e BENASSI, 2011).

O HMF é um produto intermediário da reação de Maillard e pode apresentar coloração levemente amarelada, enquanto que os produtos finais desta reação são pigmentos castanhos ou escuros conhecidos como melanoidinas (SHIBAO, 2010). O teor de HMF obtido para as amostra M3 pode ser atribuído possivelmente ao processamento ao qual este mel foi submetido, visto que esta amostra apresentou influência significativa do escurecimento não

enzimático medido pela absorvância em 420 nm. Este parâmetro é um indicativo de aplicação de aquecimento, sendo este utilizado de modo a evitar a cristalização do mel, para posterior envase e distribuição no comércio (ZAPPALÀ et al., 2005; ROTARESCU e VIDICAN, 2010).

A amostra canadense M8 apresenta uma influência significativa dos açúcares redutores, condição favorável para formação do HMF. Esta amostra é comercializada a granel e armazenada em recipientes de aço inoxidável, aquecidos de modo a evitar a cristalização do produto (TRUZZI et al., 2012; FALLICO et al., 2004). Sugere-se que estes fatores tenham contribuído para a formação do HMF. Assim, atribui-se os valores de HMF encontrados à forma de estocagem destes méis bem como a presença de açúcares redutores em altas concentrações, teores elevados de acidez e aplicação de tratamento térmico durante a estocagem, condições que são favoráveis à formação deste contaminante (CAPUANO e FOGLIANO, 2009; SPANO et al., 2009, LEMOS et al., 2010; VORLOVÁ et al., 2006; ULBRICHT et al., 1984).

### **7.2.2. Análise de Componentes Principais do Xarope**

Assim como para o mel, o xarope também apresentou HMF em sua composição, porém em maior concentração. Como já visto anteriormente, são escassos os trabalhos na literatura referentes à determinação deste contaminante neste alimento. Buscando-se verificar uma possível correlação entre os teores de HMF e as características químicas das amostras de xarope (Tabela 7.1) foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP). As variáveis analisadas foram HMF, açúcares redutores, pH, umidade, grau de escurecimento não enzimático medido pela absorvância em 420 nm, condutividade elétrica e acidez.

Os resultados da ACP sugeriram que a 1ª e 2ª componentes principais foram responsáveis por explicar 89,84% de toda a variância nos dados, considerando que a 1ª componente explicou 70,64% das relações existentes entre as variáveis e a 2ª componente explicou 19,20%.

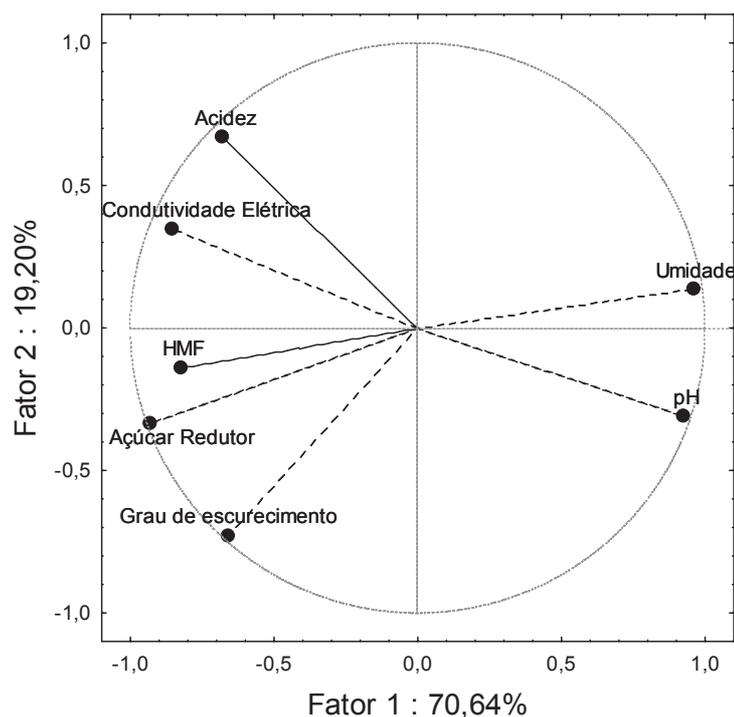
Os resultados da ACP são apresentados como escores (positivos e negativos), por meio dos quais se permite verificar quais variáveis são importantes para o CP que está sendo avaliado. Os resultados para os escores das variáveis referentes aos fatores 1 (CP1) e 2 (CP2) e as correlações, estão apresentadas na Tabela 7.3.

**Tabela 7.3.** Escores das variáveis HMF, açúcares redutores, umidade, pH, grau de escurecimento não enzimático, condutividade elétrica e acidez para as amostras de xarope.

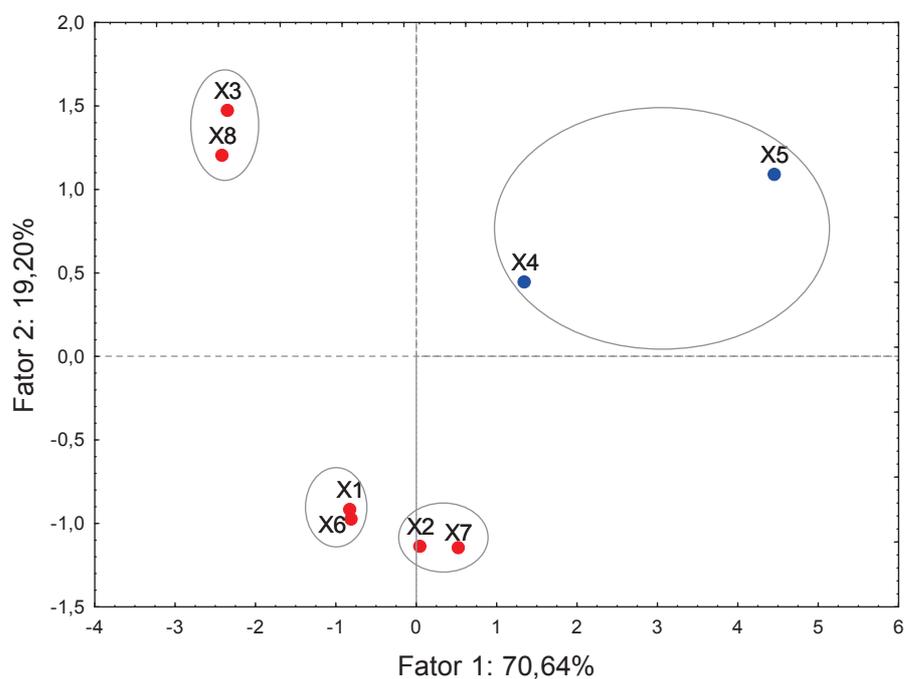
<b>Variáveis</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>
HMF	-0,823193	-0,140658
Açúcares redutores	-0,931993	-0,334170
Umidade	0,959307	0,135366
pH	0,924460	-0,309270
Grau de escurecimento não enzimático	-0,658491	-0,727952
Condutividade elétrica	-0,852426	0,345151
Acidez	-0,680600	0,670426

Como pode ser observada na Tabela 7.3, o primeiro componente (CP1) mostra que o HMF está diretamente correlacionado com açúcares redutores, grau de escurecimento não enzimático, condutividade elétrica e acidez e inversamente correlacionado com pH e umidade. De acordo com a literatura, os teores de HMF em alimentos com altos teores de carboidratos como mel e melaço de cana devem-se à maior quantidade de açúcares redutores (glicose e frutose) presentes na matriz, menores valores de pH e consequentemente maiores teores de acidez, bem como a maiores valores de condutividade elétrica e menores teores de umidade nas amostras (KHALIL et al., 2010; TOKER et al., 2013). Além disso, como já descrito para mel, a formação deste contaminante é avaliada ainda pelo grau de escurecimento não enzimático, em que maiores valores de absorbância, indicam uma maior extensão da reação de Maillard (ALMEIDA e BENASSI, 2011). Já na CP2 é possível verificar que não houve nenhuma correlação significativa do HMF com as demais variáveis.

As Figuras 7.4 e 7.5 apresentam o gráfico de pesos e o gráfico de escores, respectivamente, para as duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2), para as 08 amostras de xarope e as 07 variáveis estudadas.



**Figura 7.4.** Gráfico de pesos para a CP1 e CP2 obtidas pela análise multivariada dos dados para xarope



**Figura 7.5.** Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2 obtidas pela análise multivariada das amostras de xaropes provenientes: do ● Brasil e do ● Canadá

Na Figura 7.5, observa-se que a CP1 explica 70,64% da variabilidade nos resultados obtidos. A amostra de xarope proveniente do Canadá (X5) e dos Estados Unidos (X4) separam-se das amostras oriundas do Brasil. As amostras canadenses X4 e X5 encontram-se

agrupadas no quadrante positivo de X e positivo de Y. Os menores teores de HMF obtidos para estas amostras (Figura 7.5), observando-se o gráfico de pesos são explicados pela umidade, sendo que estas amostras apresentam maiores teores de umidade, favorecendo a obtenção de baixos teores de HMF. A amostra de xarope de glicose X4 está em um quadrante oposto ao HMF e ao grau de escurecimento não enzimático, indicando que esta apresenta teor baixo deste contaminante. Sugere-se que este fato esteja relacionado ao processamento o qual esta amostra foi submetida, provavelmente, um processamento enzimático. Este processamento ocorre com temperatura adequada e controlada, garantindo um melhor controle da qualidade do produto a ser comercializado, pois valores elevados de temperatura destroem as enzimas por desnaturação, inibindo irreversivelmente sua atividade (PINTO, 2009). Assim, a amostra X4 apresentou menor grau de escurecimento não enzimático que as amostras brasileiras.

A amostra do Canadá X5, assim como a amostra X4 encontra-se em um quadrante oposto ao HMF, apresentando assim o teor de HMF abaixo do limite de detecção (LD). Esta amostra é um xarope de bordo, como descrito no Capítulo 4, conhecido como *maple syrup* e *sirop d'érable* nos Estados Unidos e no Canadá. Esta amostra encontra-se no quadrante oposto ao HMF, açúcares redutores e grau de escurecimento não enzimático (Figuras 7.4 e 7.5) sugerindo que esta apresenta os menores valores destes fatores. Como observado na Tabela 7.1, a amostra X5 não apresenta açúcares redutores em sua composição, fato este importante para explicar a não quantificação deste contaminante visto que os açúcares redutores são essenciais para a formação de HMF (KHALIL et al., 2010). Risner et al. (2006) também analisaram um xarope de bordo e de forma similar, obtiveram valores de HMF abaixo do limite de detecção (LD).

É possível observar no CP1 (Figura 7.5), que as amostras X3 e X8, que são provenientes do Brasil, obtidas pelo fabricante A ficaram agrupadas no quadrante negativo de X e positivo de Y. O teor de HMF nestas amostras é explicado pela acidez e condutividade elétrica. As amostras brasileiras de xarope X1 e X6 (Figura 7.5) provenientes do fabricante B ficaram agrupadas no quadrante negativo de X e de Y, sendo o teor de HMF explicado pelos açúcares redutores e grau de escurecimento não enzimático. As amostras X2 e X7 foram provenientes do Brasil e do fabricante C. A amostra X2, encontra-se próxima ao eixo Y, não apresentando contribuição significativa de nenhuma das variáveis da CP1 para explicar o teor de HMF, sendo que na CP2 esse teor é explicado pelo grau de escurecimento, pH e açúcar redutor. Enquanto que a amostra X7 é influenciada pelo pH. Sugere-se também que os

elevados valores de HMF obtidos para as amostras X1 a X3 e X6 a X8 estejam relacionados ao tipo de processamento térmico utilizado para o beneficiamento do xarope e ao período longo de estocagem. Para o xarope não são apresentados na literatura limites aceitáveis deste contaminante, já que são encontrados poucos trabalhos referentes a esta matriz (VORLOVÁ et al., 2006; RISNER et al., 2006; MAKAWI et al., 2009). Estes fatores permitem sugerir ainda que não há um controle no processamento térmico destas amostras, visto que as mesmas apresentaram teores variados e elevados deste contaminante.

As amostras de xarope X1 a X3 e X6 a X8 provenientes do Brasil apresentaram os maiores teores de HMF se comparadas às amostras X4 e X5, provenientes do Canadá (Tabela 7.1), o que pode ser atribuído aos fatores: composição química, processo de obtenção dos xaropes e tempo de estocagem. Podem ser encontrados xaropes com equivalência média de dextrose (42 DE) e equivalência alta de dextrose (65 DE) (CAUVAIN E YOUNG, 2000). Desta forma, verifica-se que as amostras de xarope (Tabela 7.1) oriundas do Brasil apresentaram valores de açúcares redutores (59,45 a 64,72%), correspondentes a xaropes de equivalência de dextrose alta, enquanto que as amostras de xarope provenientes do Canadá (X5) e Estados Unidos (X4) mostraram uma faixa de açúcares redutores (37,87 a 40,32%) similar à de xaropes com equivalência média de dextrose (42 DE). Desta forma, fica evidente que os teores de açúcares redutores presentes nas amostras de xarope de glicose têm grande influência na formação de HMF. Pode-se salientar que o xarope de glicose 42 DE, apresenta maiores valores de umidade bem como a presença de maiores teores de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) (250 – 400 ppm) que o xarope com 65 DE (SO<sub>2</sub> = 20 – 40 ppm). O SO<sub>2</sub> origina-se no processo de obtenção do amido a partir do milho e previne a formação de coloração no xarope durante a estocagem em altas temperaturas, pois reage com o HMF formando ácidos hidróxilquilsulfônicos (PINTO, 2009; AZEVÊDO et al., 2007).

Assim, os teores de HMF encontrados nas amostras de xarope podem ser explicados pela composição química dos mesmos (maiores teores de açúcares redutores, baixos valores de pH e umidade). Além disso, os maiores valores de absorvância em 420 nm (grau de escurecimento) apresentam também contribuição para o teor de HMF obtido para as amostras, indicando a influência do processamento térmico aplicado às mesmas.

### 7.2.3. Análise de Componentes Principais de Melaço de Cana

As amostras de melaço de cana também apresentaram teores variados de HMF em sua composição (Tabela 7.1). Para estabelecer se haviam correlações entre as características físico-químicas e os teores de HMF foi aplicada uma Análise de Componentes Principais (ACP). Os resultados da ACP sugerem que a 1ª e 2ª componentes principais foram responsáveis por explicar 78,32% de toda a variância nos dados, considerando que a 1ª componente explicou 49,55% das relações existentes entre as variáveis e a 2ª componente explicou 28,77%.

Os resultados da ACP são apresentados como escores. Os resultados para os escores das variáveis referentes aos fatores 1 (CP1) e 2 (CP2) e as correlações, estão apresentadas na Tabela 4.9.

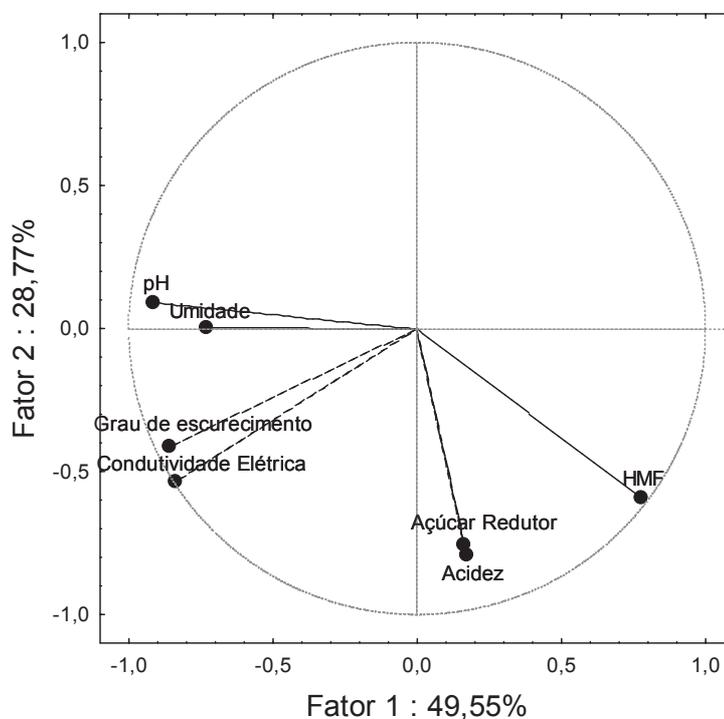
**Tabela 7.4.** Escores das variáveis HMF, açúcares redutores, umidade, pH, grau de escurecimento não enzimático, condutividade elétrica e acidez para as amostras de melaço de cana.

Variáveis	CP1	CP2
HMF	0,775911	-0,592702
Açúcares redutores	0,161080	-0,755817
Umidade	-0,728687	0,004322
pH	-0,917081	0,091943
Grau de escurecimento não enzimático	-0,860843	-0,414602
Condutividade Elétrica	-0,835761	-0,534676
Acidez	0,170311	-0,790725

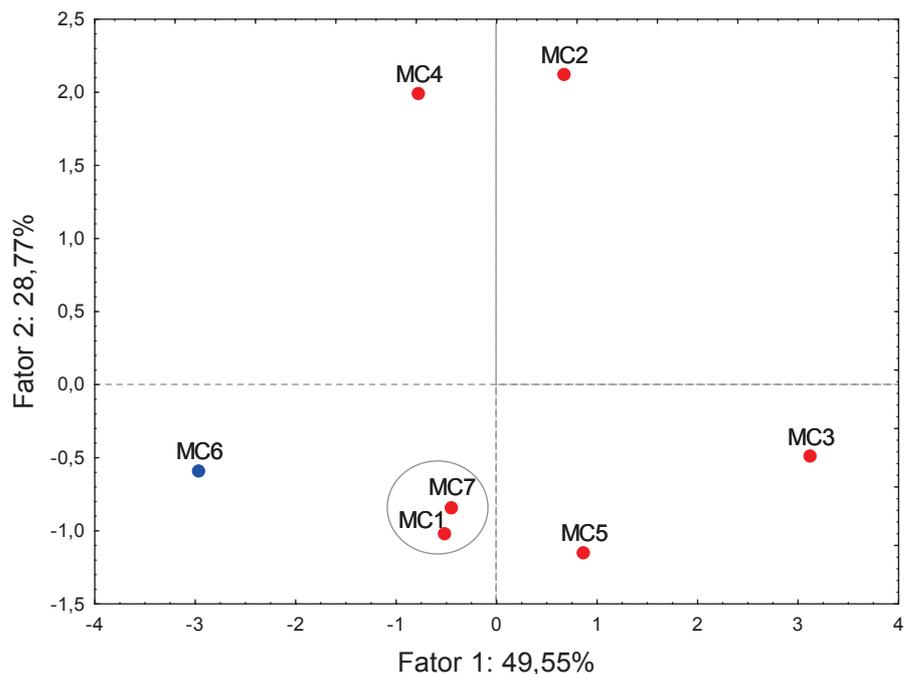
Como pode ser observada na Tabela 7.4, o primeiro componente (CP1) mostra que o HMF está inversamente correlacionado com a umidade, pH, grau de escurecimento não enzimático e a condutividade elétrica, e não apresentou correlação significativa com açúcares redutores e acidez. Segundo Toker et al. (2013), estes fatores são importantes para a formação do HMF, sendo que amostras que contém menores teores de umidade e valores de pH, apresentam maiores teores deste contaminante. Como mencionado anteriormente, o grau de escurecimento não enzimático avaliado pela medida de absorvância em 420 nm é um fator que influencia na formação do HMF, sendo observados os maiores teores deste contaminante em amostras de melaço de cana com maiores valores de absorvância em 420nm. (TOKER, 2013; ALMEIDA e BENASSI, 2011). No entanto, para o presente estudo foi verificado na CP1 que o HMF é inversamente proporcional ao grau de escurecimento não enzimático para

as amostras de melão analisadas (Tabela 7.4). Sugere-se que este fator esteja relacionado com o avanço na Reação de Maillard, visto que o HMF é um intermediário da reação, possibilitando a conversão deste contaminante para obtenção dos produtos finais da reação, como as melanoidinas (OETERRER, 2006). Já na CP2 é possível verificar que o HMF está diretamente correlacionado com açúcares redutores e acidez e não apresenta correlação significativa com os demais fatores.

As Figuras 7.6 e 7.7 apresentam o gráfico de pesos e o gráfico de escores, respectivamente, para as duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2), para as 07 amostras de melão de cana e os 07 componentes estudados.



**Figura 7.6.** Gráfico de pesos para a CP1 e CP2 obtidas pela análise multivariada dos dados para melão de cana



**Figura 7.7.** Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2 obtidas pela análise multivariada das amostras de melão de cana provenientes: do ● Brasil e do ● Canadá

A amostra MC6 proveniente do Canadá não se agrupa com nenhuma das outras amostras (Figura 7.7). Como observado no gráfico de pesos (Figura 7.6), esta amostra apresenta os maiores valores para grau de escurecimento não enzimático medido pela absorvância em 420 nm e de condutividade elétrica. No entanto, apresenta baixo teor de HMF. Como já descrito anteriormente, a absorvância em 420 nm é um indicativo da extensão da Reação de Maillard (ALMEIDA e BENASSI, 2011). Os maiores valores indicam a presença de pigmentos castanhos considerados como produtos finais desta reação e que são obtidos somente quando a amostra é submetida a processamento ou estocagem inadequados (TOKER et al., 2013). Portanto, sugere-se que esta amostra tenha sido submetida a altas temperaturas durante o processamento, consumindo produtos intermediários, como o HMF para a obtenção dos produtos finais, o que contribuiu para a determinação de teores de HMF mais baixos.

É possível observar que a amostra MC3, não se agrupa com as demais amostras e apresenta o maior teor de HMF (Figura 7.6 e 7.7). Esta amostra é influenciada pelos açúcares redutores e acidez, que são condições favoráveis para a formação deste contaminante neste tipo de matriz (SPANNO et al, 2006; KHALIL et al., 2010). De forma similar, o teor de HMF obtido para a amostra MC5 também apresenta influência significativa dos açúcares redutores e da acidez, enquanto que as amostras MC1 e MC7, oriundas do Brasil e provenientes do

mesmo produtor, separam-se pela influência mais significativa da condutividade elétrica e do grau de escurecimento não enzimático. Diante disso, sugere-se que os valores de HMF para estas amostras estejam relacionados também ao processamento térmico, a que estas amostras foram submetidas. Como já descrito no Capítulo 4, algumas amostras de melaço de cana são obtidas de forma artesanal, sem um controle rigoroso da temperatura durante o cozimento do caldo de cana, o que pode favorecer a obtenção de valores elevados de HMF.

A amostra MC4 (Figura 7.7) que se encontra em um quadrante oposto ao HMF apresenta um valor baixo deste contaminante. Como se observa na Figura 7.7, esta amostra é influenciada pelo pH, visto que o HMF é inversamente correlacionado com esta variável. Já a amostra MC2, encontra-se no quadrante positivo de X e de Y, indicando que esta amostra apresenta valores baixos de todos os fatores avaliados.

### **7.3. Conclusões parciais**

Os resultados obtidos permitiram estabelecer correlações entre os teores de HMF e as características químicas, tipo de processamento térmico e tempo de estocagem para os alimentos analisados através do emprego da Análise de Componentes Principais. Os resultados demonstraram uma variabilidade nos teores de HMF obtidos para as diferentes matrizes (mel, xarope e melaço de cana). Foi possível verificar que a variabilidade apresentada não teve influência significativa do tempo de estocagem, mas foi afetada pela composição química e tipo de processamento adotado. Os diferentes teores de HMF obtidos para mel podem ser explicados pela composição química das amostras (açúcares redutores, grau de escurecimento não enzimático e acidez), bem como ao processo de aquecimento que algumas amostras foram submetidas favorecendo a formação de maiores teores deste contaminante. A variabilidade nos teores de HMF para xarope deve-se à composição química das amostras (maiores teores de açúcares redutores, baixos valores de pH e umidade), bem como ao processamento térmico ao qual estas amostras são submetidas, devido aos maiores valores de absorvância em 420 nm (grau de escurecimento não enzimático), sugerindo que não há um controle adequado da etapa de aquecimento durante sua produção. As amostras de melaço de cana também sofrem influência da composição química, principalmente dos açúcares redutores, da acidez, da condutividade elétrica bem como do processamento térmico aplicado às amostras. Este último fator torna-se preocupante, considerando a importância e a necessidade de um controle de qualidade de alimentos, para garantir a segurança alimentar

dos mesmos. Para tanto, foi possível neste trabalho utilizar o grau de escurecimento não enzimático (absorbância em 420 nm) como parâmetro para avaliar a forma de processamento térmico aplicado às amostras, considerando que não foram encontrados trabalhos na literatura que investigaram este fator na formação de HMF nestas matrizes alimentares.

#### 7.4. Referências

ALMEIDA, M. B.; BENASSI, M. de T. Atividade antioxidante e estimativa do teor de melanoidinas em cafés torrados comerciais. *Ciências Agrárias*. v. 32. p. 1893-1900. 2011.

ASKAR, A. Flavour changes during production and storage of fruit juices. *Fluessiges Obst*. 51, 564–569. 1984.

AZEVÊDO, L. C.; REIS, M. M.; SILVA, L. A. da; ANDRADE, J. B. de. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Química Nova*. v. 30. n. 8. p. 1968-1975. 2007.

BATH, P.K., SINGH, N. A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Food Chemistry*. v. 67. p. 389–397.1999.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Food Chemistry. 4 ed. Lichtenbergstraße: Springer, 2009.

BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; ODDO, L. P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*. v. 35. p. S4-S17. 2004.

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

CAUVAIN, S.; YOUNG, L. Bakery Food Manufacture e Quality: Water Control and Effects. Oxford: Blackwell Science, 2000.

FALLICO, B.; ZAPPALÀ, M.; ARENA, E.; VERZERA, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*. v. 85. p. 305–313. 2004.

KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and Chemical Toxicology*. v. 48. p. 2388–2392. 2010.

LEMOES, G. da S.; SANTOS, J. S. dos; SANTOS, M. L. P. dos; Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. *Química Nova*. v. 33. n. 8. p. 1682-1685. 2010.

LIANDA, R. L. P. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia Líquida de Alta Eficiência e avaliação do potencial antioxidante. 2009. 185f. Tese (Doutorado em Química – Química dos Produtos Naturais)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

LIENOVEN, S.; LAAKSONEN, T.; ROOS, A.H. Nonenzymatic Browning in Food Models in the Vicinity of the Glass Transition: Effects of Fructose, Glucose, and Xylose as Reducing Sugar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 50. p. 7034–7041. 2002.

MAKAWI, S. Z. A.; TAHA, M. I.; ZAKARIA, B. A.; SIDDIQ, B.; MAHMOD, H.; ELHUSSEIN, A. R. M.; KARIEM, E. <sup>a</sup> G.; Identificatioes and quantification of 5-Hydroxymethyl Furfural HMF in some sugar-containing food products by HPLC. *Pakistan Journal Nutrition*. v. 8. n. 9. p. 1391-1396. 2009.

MINGOTI, S. A. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: Uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: UFMG, 2005.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. São Paulo: Manole, 2006.

PELLERANO, R. G.; UÑATES, M. A.; CANTARELLI, M. A.; CAMIÑA, J. M.; MARCHEVSKY, E. J. Analysis of trace elements in multiflora Argentine honeys and their classification according to provenance. *Food Chemistry*. v. 134. p. 578-582. 2012.

PINTO, M. P. Optimização dos processos de produção de xaropes de glucose e dextrose monohidratada. 2009. 40f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

RISNER, C. H.; KISER, M. J.; DUBE, M. F. An Aqueous High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey and Other Sugar-containing Materials. *Journal of Food Science*. v. 71. n. 3. p. 179-184. 2006.

ROTARESCU, R.; VIDICAN, C. Impactis assessment of thermal processing and storage conditions on enzymatic activity and HMF content in honey. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*. v. 2. p. 1-13. 2010.

SERRA-CAYUELA, A.; AGUILERA-CURIEL, M. A.; RIU-AUMATELL, M.; BUXADERAS, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E. Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker. *Food Research International*. v. 53. p. 226–231. 2013.

SHIBAO, J. Avaliação do teor de Produtos da Reação de Maillard (PRM) em cereais matinais e café. 2010. 101f. Dissertação. (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPANO, N.; CASULA, L.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SCANU, R.; TAPPARO, A.; SANNA, G. An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey: The case of strawberry tree honey. *Talanta*. v. 68. p. 1390-1395, 2006.

SPANO, N.; CIULU, M.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SALIS, S.; SANNA, G. A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey. *Talanta*. v. 78. p. 310-314, 2009.

TOKER, O. S.; DOGAN, M.; ERSÖZ, N. B.; YILMAZ, M. T. Optimization of the content of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) formed in some molasses types: HPLC-DAD analysis to

determine effect of different storage time and temperature levels. *Industrial Crops and Products*. v. 50. p. 137-144. 2013.

TRUZZI, C.; ANNIBALDI, A.; ILLUMINATI, S.; FINALE, C.; ROSSETTI, M.; SCARPONI, G. Determination of Very Low Levels of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) in Natural Honey: Comparison Between the HPLC Technique and the Spectrophotometric White Method. *Journal of Food Science*. v. 77. p. 784-790. 2012.

ULBRICHT, R. J.; NORTHUP, S. J.; THOMAS, J. A. A Review of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*. v. 4. p. 843-853. 1984.

VORLOVÁ, L.; BORKOVCOVÁ, I.; KALÁBOVÁ, K.; VEČEREK, V. Hydroxymethylfurfural contents in foodstuffs determined by HPLC method. *Journal of Food and Nutrition Research*. v. 45. n.1. p. 34-38. 2006.

WEI, Z.; WANG, J.; WANG, Y. Classification of monofloral honeys from diferente floral origins and geographical origins based on rheometer. *Journal of Food Engineering*. v. 96. p. 469-479. 2010.

ZAPPALÀ, M.; FALLICO, B.; ARENA, E.; VERZERA, A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*. v. 16. p. 273-277. 2005.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

## **CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES**

## CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizados estudos de otimização e validação de metodologias analíticas para a determinação de HMF em amostras de mel, de xarope e de melaço de cana oriundas do Brasil e do Canadá por diferentes ferramentas quimiométricas bem como um estudo de correlação dos teores de HMF encontrados com a composição química dos alimentos investigados.

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu a validação intralaboratorial de um método de CLAE-UV para determinação de HMF em amostras de mel, de xarope e de melaço de cana, visto a escassez na literatura de trabalhos relacionados às duas últimas matrizes. Para tal estudo, foi possível a utilização de ferramentas estatísticas sofisticadas, de modo a melhor avaliar os resultados obtidos e o desempenho do método. É possível considerar que o mesmo apresentou linearidade adequada na faixa de calibração utilizada, foi seletivo para todas as amostras analisadas e apresentou precisão e exatidão adequadas. Esses fatores mostraram que o método cromatográfico foi eficaz para determinação deste contaminante nos alimentos analisados permitindo assim a aplicação deste em amostras brasileiras e canadenses, de teores de HMF variados. Diante disso, torna-se evidente que o método de CLAE-UV validado é robusto, permitindo a quantificação deste contaminante em amostras que contenham uma ampla faixa de concentrações de HMF em sua composição. Além disso, este apresenta outras vantagens em relação aos métodos cromatográficos existentes na literatura como a rapidez da análise e a não utilização de qualquer tipo de preparo de amostra.

O presente estudo permitiu ainda, a realização inédita de um estudo de otimização e validação intralaboratorial de um método espectrofotométrico para a determinação de HMF em amostras de xarope por meio de diferentes ferramentas quimiométricas. O método proposto apresentou linearidade, precisão e exatidão adequadas demonstrando a sua eficiência para quantificação deste contaminante neste alimento. Estes fatores tornam-se importantes para o desenvolvimento desta pesquisa, visto que não há um método espectrofotométrico otimizado e validado para esta matriz na literatura e o método proposto neste trabalho é economicamente viável, de fácil execução, podendo ser aplicado em indústrias de pequeno e médio porte para controle de qualidade ou por órgãos regulamentadores.

Neste estudo foi realizada também a análise da composição físico-química das amostras, de modo a verificar as possíveis relações destes fatores com os diferentes teores de HMF nas amostras analisadas. Estes resultados puderam ser avaliados por meio da análise de

componentes principais (ACP), as quais indicaram, de forma geral, que o tempo de estocagem não foi um fator significativo para os teores de HMF obtidos para as amostras. Entretanto, os teores de HMF para os três alimentos investigados foram influenciados pelo tipo de processamento térmico (absorbância em 420 nm) e a composição físico-química das amostras (açúcares redutores, acidez e pH). As amostras de xarope foram influenciadas ainda pela umidade, enquanto que as amostras de melaço de cana sofreram influência da condutividade elétrica. Esses fatores demonstram a importância de se realizar um controle de qualidade mais rígido nestes alimentos, visto que são vários os fatores que podem influenciar na formação do HMF e este contaminante pode gerar riscos à saúde humana devido a potencial toxicidade apresentada pelo mesmo.

## **CAPÍTULO 9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

## 9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A realização deste estudo permitiu a otimização e validação de novas metodologias analíticas para a determinação de HMF, bem como estabelecer correlações entre o tipo de processamento, composição química e tempo de estocagem e os teores de HMF, os quais conduziram a novas ideias a cerca desta linha de pesquisa. Assim, por meio deste trabalho torna-se possível sugerir novas possibilidades de pesquisas a serem desenvolvidas, entre elas podem ser citadas:

- ✓ Verificar se os teores de flavonóides e de compostos fenólicos, bem como de metais essenciais são também fatores importantes para explicar as diferenças nos teores de HMF dos alimentos investigados;
- ✓ Desenvolver e validar uma nova metodologia cromatográfica para a determinação de HMF em amostras de açúcar mascavo fazendo uso de diferentes ferramentas quimiométricas;
- ✓ Investir em novos estudos do método espectrofotométrico para o melaço de cana e outros alimentos como sucos e geleias de frutas.