

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA
DO FURFURAL E DO p-HIDROXIMETILFURFURAL

POR

MÁRIO DA CUNHA RAMOS

E

LOURDES GUEDES GOMES

Instituto do Vinho do Porto

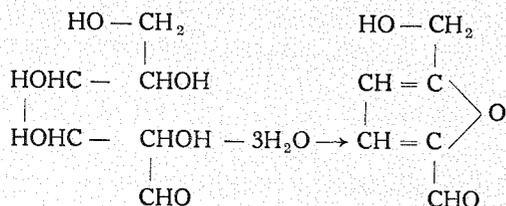
INTRODUÇÃO

A importância que ultimamente se tem atribuído à presença do p-hidroximetilfurfural (HMF) em alguns produtos alimentares, designadamente em méis, sumos de fruta, concentrados de sumos e bebidas alcoólicas, traduz-se duma maneira significativa pelo número de estudos publicados.

Em alguns concentrados, como massa de tomate, o escurecimento do produto — segundo as chamadas reacções de Maillard — com quebra da sua boa apresentação, levou os investigadores a proceder a numerosos ensaios antes de descobrirem as causas dessa coloração e proporem as formas de as anularem. Ao HMF foi atribuída, pelo menos em parte, a responsabilidade dessa cor indesejável, por provocar a formação, através de condensações e polimerizações, de complexos humínicos. Por outro lado, o HMF, quando ligado a um processo de inversão de açúcares, coloca-se como factor interpretativo valioso na fiscalização bromatológica.

Recebido para publicação em 22/6/68.

O HMF é um aldeído heterocíclico com cinco átomos, dos quais um é o oxigénio, e contendo duas duplas ligações, o grupo aldeídico e o do hidroximetilfurfural. Daí, rico em cromóforos e apresentando um auxocromo (CH₂OH), condições favoráveis a uma forte absorção no ultravioleta. Geralmente, provém duma hexose, pela perda de três moléculas de água, conforme esquematicamente se aponta:



Admite-se que também possa provir da reacção da glucose com um aminoácido.

Duma maneira semelhante foi atribuído ao furfural (F), aldeído existente nas bebidas alcoólicas e derivado doutra classe de açúcares — pentoses — e doutros compostos com grupos carboxílicos, um valor bromatológico de certo relevo.

Por se poderem encontrar como produtos naturais no Vinho do Porto, fica largamente justificada a intenção de se procurar um método satisfatório para a determinação destes dois compostos.

Parece-nos conveniente fazer uma rápida anotação dos métodos preconizados para esse fim, embora não desejemos alongar-nos neste particular.

Dos métodos ponderais podemos distinguir os que empregam, respectivamente, a floroglucina, a 2-4- dinitrofenilhidrazina, o p-nitrobenzohidrazina que originam floroglucidos e hidrazonas.

São métodos que deixam a desejar pela variação molecular dos compostos obtidos, não oferecendo valores duma reprodutibilidade de apreço.

Também, pelo menos no nosso caso, obrigam a uma extracção prévia do F e do HMF por solventes, pecando, a deste último, por incompleta.

Os barbitúricos — ácido barbitúrico e ácido tiobarbitúrico — dão com o F e o HMF produtos de condensação precipitáveis.

A reacção é interferida pela presença dos açúcares, doutros aldeídos e de cetonas.

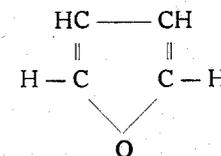
Como métodos colorimétricos podem-se citar os que se baseiam na reacção da anilina com o F, reacção clássica, velha dum século, na reacção com o orcinol e naquela que põe em presença o ácido barbitúrico — toluidina. Há muitas variantes na confecção do reagente anilina-ácido, cada qual com os seus paladinos.

Só em altas concentrações o HMF dá reacção corada com a anilina. Contudo, parece incontestável que em meio anilina-ácido há uma absorção luminosa intensa na banda do UV.

Oferecendo inúmeras vantagens de ordem operatória, — rapidez, simplicidade — e com um mínimo de exactidão desejável, apresenta-se o método espectrofotométrico.

É a este método que dedicaremos o nosso estudo.

É importante observar que não é lícito admitir unicamente nos vinhos a presença do F e do HMF. Além destes, há outros compostos furânicos, como o álcool furfurílico, o ácido furoico, o metilfurfural, a furoína e o furil, todos possuindo o radical furfurano



que estão intimamente ligados ao comportamento químico e biológico dos açúcares.

Haveria razões, pois, para a sua existência nos vinhos, principalmente nos vinhos licorosos.

É um problema a dilucidar, como o é também o que diz respeito a muitos compostos alifáticos, mono e dicarbonílicos, ligados a fenómenos de fermentação vinária, e apresentando absorção característica no UV.

PARTE EXPERIMENTAL

Não são todos os autores concordes no coeficiente de extinção molecular ou absorptividade molar do F e do HMF, nos comprimentos de onda escolhidos

$$e = \frac{A}{b \times c}$$

b = 1
c — expresso em moles

Pode derivar este facto do produto empregado nos ensaios não ser completamente puro.

Os dois compostos são susceptíveis de se obter no Laboratório por reacções relativamente simples. A sua purificação é que demanda cuidados especiais de certa delicadeza, destacadamente no que diz respeito ao HMF.

Em alguns ensaios que efectuámos servimo-nos dum HMF preparado por nós, conforme o estabelecido por HAWORTH & JONES, a partir da sacarose. A sua purificação verificou-se não ser perfeita. Obtivemos uma absorptividade molar de $e = 9,40$. Num HMF comprado no mercado obtivemos $e = 14,74$.

Parece-nos não ser desrazoável insistirmos neste ponto. O diagrama padrão oferecer-nos-á, em última instância, os teores de F e HMF que marcam as amostras a analisar. Se os reagentes que servirem para o padrão não forem isentos de impurezas, origina-se um erro de difícil correcção.

Mesmo admitindo que a um determinado comprimento de onda a absorptividade molar exacta é a indicada por um autor, o que envolve, implicitamente, ser o reagente utilizado, p. a., mesmo assim, quem trabalhar com um HMF doutra origem, e que dê uma «e» diferente, pode não encontrar um factor de correcção absolutamente impecável. Um «e» que difira do considerado normal pode não traduzir uma diluição, mas a existência de impurezas com facultade de absorção no mesmo comprimento de onda, ou muito próximo, o que falseia o factor de correcção.

Ao problema, colocado entre estes limites, não enxergamos solução.

Não damos primazia de exactidão analítica a qualquer outro método, colorimétrico ou ponderal, que nos possa servir cabalmente para aferir o espectrofotométrico. Temos, pois, que aceitar os factos como eles se nos apresentam.

Reconhecida, como é, a elevada absorção no UV quer do F quer do HMF, não sofre dúvida a idoneidade do método espectrofotométrico, para a determinação dos referidos compostos.

Dada a identidade das curvas de absorção do F e do HMF, o que torna, pela leitura directa corrente, impossível determinar os teores correspondentes a cada um dos referidos compostos, pode-se recorrer à separação prévia do F, por destilação da amostra em análise.

Não são muito concordantes os valores encontrados na bibliografia a respeito das absorções máxima e mínima do F e do HMF. Citaremos algumas.

LINDEMANN (1955), regista como picos de absorção: máxima, para o HMF, a 284 $m\mu$, e para o F, a 275; mínima, para o HMF, a 245 $m\mu$ e, para o F, a 243.

FRIEDMANN *et coll.* fixam: máxima, para o HMF, a 284 e, para o F, a 277; mínima, para o HMF, a 229 e, para o F, igualmente a 229.

Como absorptividade molar

$$e_{\lambda 284} = 16,750 \text{ (HMF)}$$

$$e_{\lambda 277} = 15,375 \text{ (F)}$$

TRIFIRÒ, apresenta para o HMF

$$e_{\lambda 285} = 16,500$$

e, BETHGE, dá como absorção máxima, para o F, a 277,5 e, para o HMF, a 284,5.

DE FRANCESCO & G. MARGHERI indicam para o HMF um máximo a 282 $m\mu$ e um mínimo à volta de 245.

Obedecendo as leituras que serviram para traçar o diagrama padrão e aquelas da amostragem a normas iguais, não têm significado as diferenças que se podem observar medindo em comprimentos de onda muito próximos.

Adoptámos para as leituras espectrofotométricas do F $\lambda = 275$ e $\lambda' = 245$ e para o HMF $\lambda = 282$ e $\lambda' = 245$.

Quer os valores típicos de extinção nos máximos e nos mínimos, quer a sua diferença constituem grandezas características em relação a estes dois compostos (Lindemann).

O diferencial das extinções permite corrigir a interferência de algumas impurezas. Foi desta última maneira que operámos. A água destilada serviu para o ensaio em branco.

As curvas de absorção obedecem à lei de Beer.

Depois de ensaios em aparelhos variados, fixámo-nos num conjunto Quickfit, semi-micro, originariamente indicado para o azoto (Fig. 1).

Trabalhámos com um espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer.

Como a diferença de teor em F e HMF no Vinho do Porto pode ser muito acentuada, nem sempre convém aproveitar uma só operação para determinar os dois compostos.

Como o operatório é extremamente simples e rápido, prescinde-se de averiguar previamente da qualidade da amostra, e realizam-se duas destilações independentes, servindo uma para a determinação do F e a outra do HMF.

Pareceu-nos de muito interesse traçar a curva de absorção espectrofotométrica no UV do Vinho do Porto, após preparação da amostra conforme a técnica habitual. O espectro de absorção é absolutamente característico, e demonstra a presença de HMF (Fig. 3) em confronto com a do HMF que utilizamos para o padrão (Fig. 2).

Em Vinhos do Porto velhos, e mais, envelhecidos em condições particulares, como aconteceu com alguns vinhos elementares da Quinta de Santa Bárbara, Pinhão — Estação Vitivinícola do Douro — que figuram neste trabalho, servimo-nos de células de 1 cm para ambos os compostos, e das diluições mais altas, devido à sua riqueza em HMF e F.

A destilação pelo vapor de água, conforme o estabelecido, elimina completamente o F que passa para o destilado e não altera o HMF que permanece residualmente.

Fizemos alguns ensaios de recuperação. Em solução aquosa obtivemos pelo UV 6,25 mg $\%$, pelo m-aminofenol 6,50 de F. Ao resíduo de destilação dum vinho, portanto desprovido de F, adicionámos 0,088 mg desse composto e destilámos novamente. Encontrámos no destilado o mesmo valor.

Em relação ao HMF, as recuperações em meio aquoso ou hidroalcoólico são totais, tendo em conta, é claro, a sensibilidade do aparelho. Em relação a qualquer vinho, servindo de ensaio em branco o vinho antes da encorporação, para o mesmo vinho encorporado, ambos defecados, a recuperação é praticamente de 100%. O mesmo acontece em encorporações com Vinho do Porto velho, usando a água para o ensaio em branco.

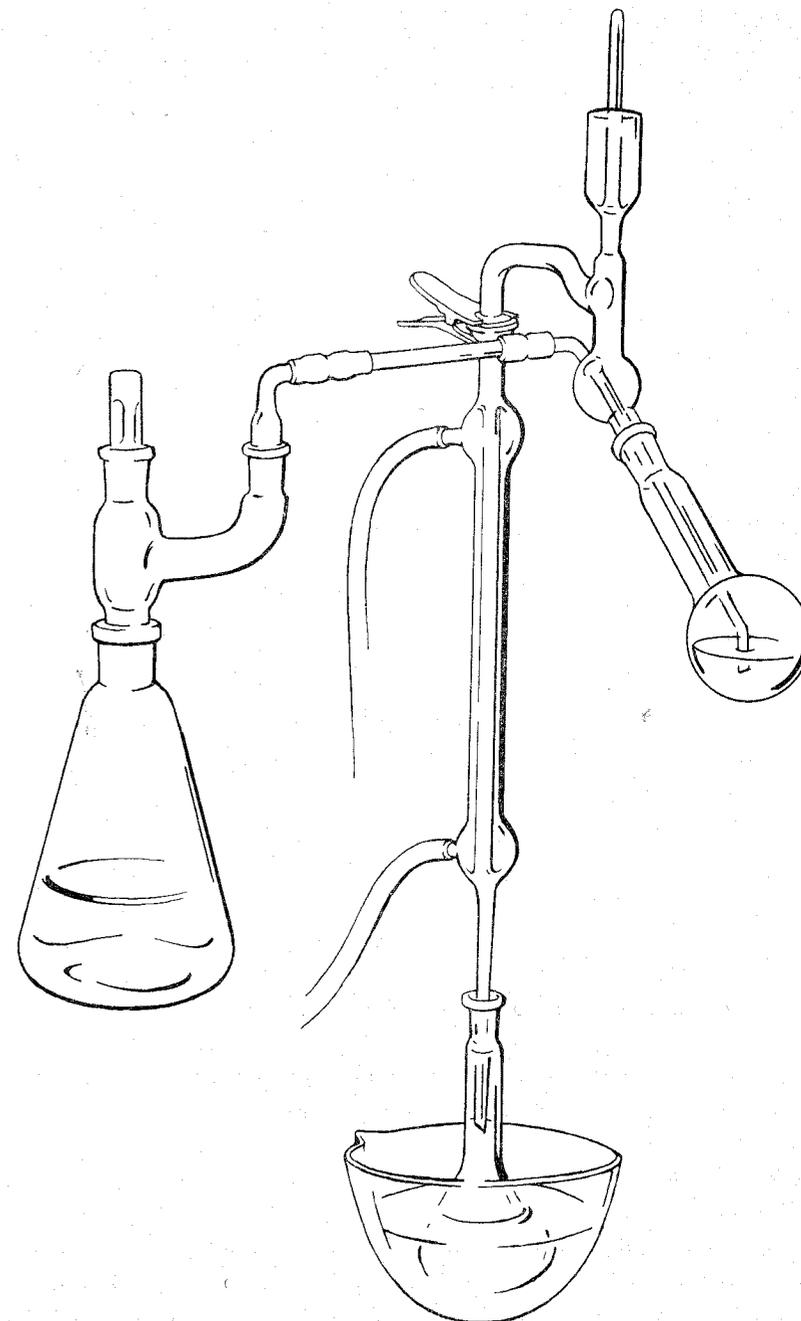


Fig. 1 — Aparelho de destilação.

Com vinhos novos, a recuperação vai de noventa a cem, ou cento e tantos por cento.

A determinação do HMF no vinho por espectrofotometria no UV, e nos comprimentos de onda aconselhados, não se pode

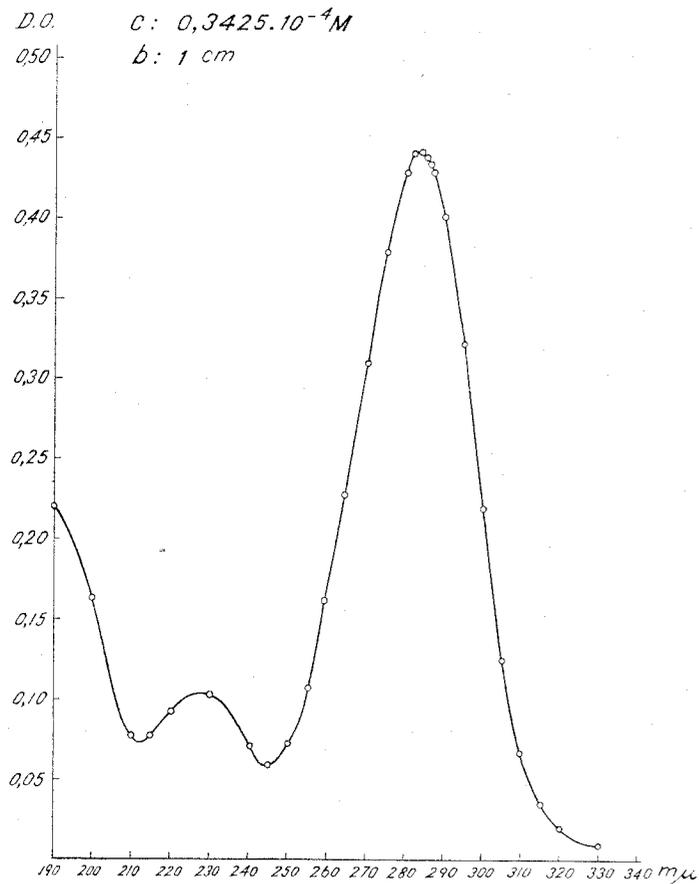


Fig. 2 — Espectro de absorção no UV do p-hidroximetilfurfural.

fazer sem eliminação da matéria corante, activa e interferente nessa região.

A defecação pelo acetato de zinco-ferrocianeto (Carrez) para os vinhos acentuadamente corados, é inoperante. Nos ensaios em que empregámos diversos carvões descorantes, houve sempre perdas. No seguimento de trabalhos nossos anteriores,

aproveitando o comportamento excepcional do cádmio como defecante, aplicámo-lo ao Vinho do Porto para avaliar das suas

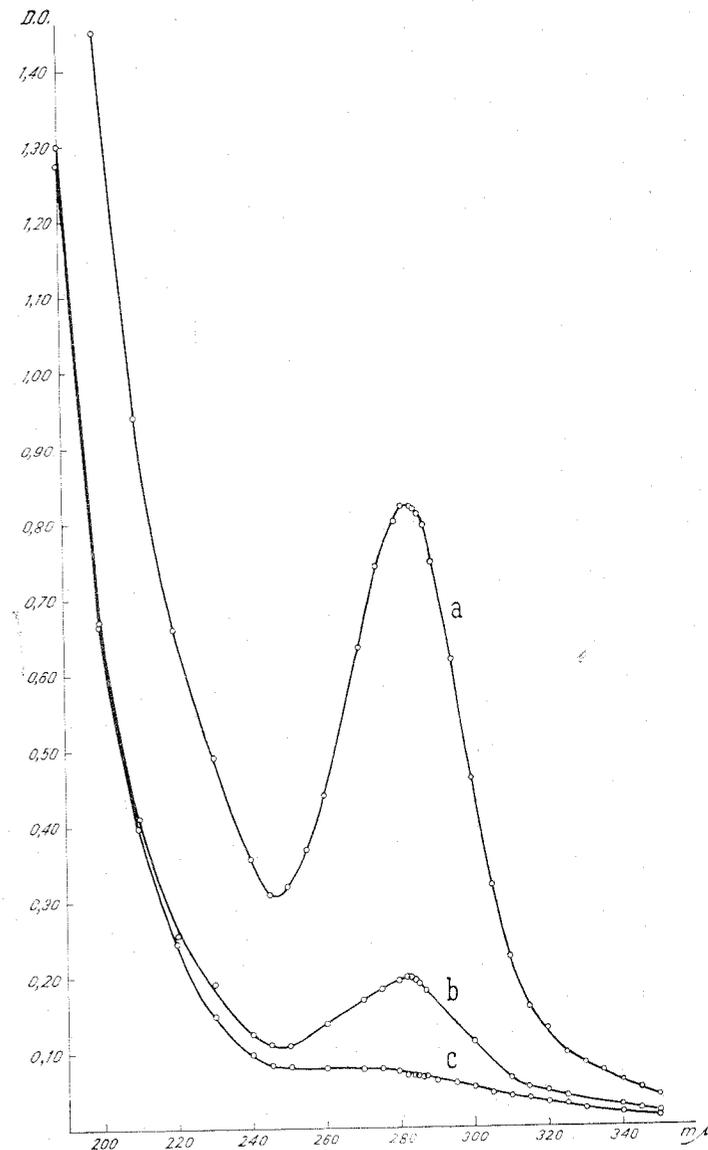


Fig. 3 — Espectro de absorção de Vinho do Porto: a, 314 mg/l; b, 62 mg/l; c, 0 mg/l de HMF.

possibilidades na determinação do HMF, por espectrofotometria no UV.

Verificámos que o sulfato de cádmio não reage com o HMF, nem possui absorção nos comprimentos de onda desejáveis.

Depois de numerosos ensaios, alguns prejudicados pela adsorção do HMF pelo hidróxido de cádmio, fenómeno ligado, por consequência, ao pH do meio, estabelecemos as condições que nos pareceram necessárias.

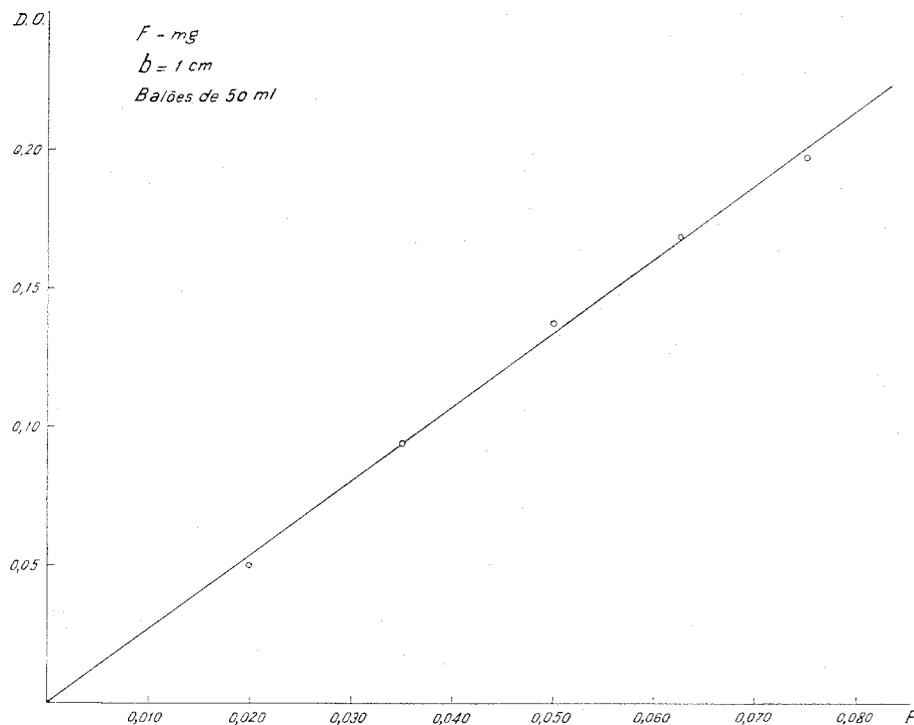


Fig. 4 — Curva padrão dos valores diferenciais de absorção a 277 e 245 $m\mu$ do furfural.

Os vinhos, os vinagres, as aguardentes e os mostos podem-se submeter ao método que preconizamos para a determinação do F e do HMF.

MÉTODO

Determinação do furfural

Reagentes

- 1) Solução de sulfato de cádmio a 20 %;
- 2) Soda normal.

Estabelecimento da curva padrão

Efectuaram-se as diluições que estão representadas nos valores da Fig. 4. O furfural foi previamente purificado.

Como já dissemos, os valores da curva representam a diferença entre os valores de absorvidade a 275 e a 245 $m\mu$.

$$a_{275} - a_{245} = D$$

O diferencial D é o que se determina nos ensaios e o que figura na curva padrão.

Modo operatório

Medem-se 10 ou 20 ml do produto a ensaiar, depois de alcalinizado a pH 7,5-8, no balão destilatório. O destilado (aproximadamente 20 ml), recebido num balão de 25 ou de 50 ml, conforme a riqueza original em F, observa-se, dentro do mesmo critério, em célula de 1 cm ou de 2 cm. Escolhe-se também o padrão ou o factor mais conveniente.

Determinação do p-hidroximetilfurfural

Estabelecimento da curva padrão

Partiu-se duma solução concentrada hidroalcoólica, conservada em frigorífico.

As diluições são representadas na Fig. 5. Podem-se escolher outras que se entendam mais apropriadas ao padrão.

Modo operatório

Medem-se 20 ml de vinho para um balão de 50 ml e 2,5 da solução de sulfato de cádmio. Alcaliniza-se com soda normal até pH 8-8,5. Agita-se, perfaz-se o volume e homogeneiza-se. Após completa floculação, filtra-se, tomam-se 20 ml e destilam-se até que passem aproximadamente 20 ml de destilado que contém a totalidade do furfural.

Arrefece-se o resíduo da destilação, passa-se para um balão de 50 ou de 100 ml, perfazendo o volume com águas de lavagem.

Quando, por excesso de condensação de vapor de água é necessário utilizar o balão de 100 ml, o resultado terá que se multiplicar por dois para entrar no gráfico ou usar uma célula

de 2 cm. Claro que se pode também estabelecer uma curva padrão mais consentânea com o que se deseja. Os cálculos far-se-ão em conformidade com as leituras a 282 e 245 e pela diferença dos valores de absorvidade

$$a_{282} - a_{245} = D$$

que figura no gráfico (Fig. 5).

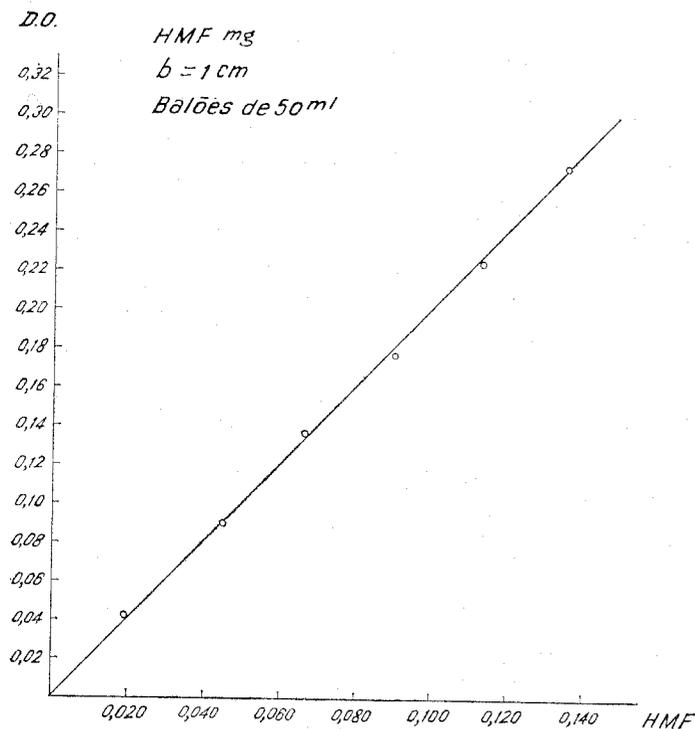


Fig. 5 — Curva padrão dos valores diferenciais de absorção a 282 e 245 m μ do p-hidroximetilfurfural.

RESULTADOS

Em relação ao Vinho do Porto, novo ou velho, os teores do F e do HMF afastam-se bastante, destacadamente os do segundo.

Tivemos oportunidade de estudar uns vinhos elementares de castas durienses, obtidos na Quinta de Santa Bárbara,

Pinhão — Estação Vitivinícola do Douro — amostras já com certa idade que acusavam percentagens invulgares de HMF e, em nível muito mais baixo, de F.

É possível que alguns factores de colheita, preparo e conservação tivessem concorrido, cumulativamente com a idade, para os valores que observámos. Há uma certa proporcionalidade entre os quantitativos de F e HMF, como se pode verificar no Quadro I.

QUADRO I

N.º de ordem	Castas	Ano	F, mg ‰	HMF, mg ‰
1	Touriga Nacional	1932	20,0	515
2	» »	1933	15,6	451
3	» »	1934	24,6	502
4	» »	1935	7,6	227
5	» »	1936	10,3	285
6	» »	1937	18,0	462
7	» »	1939	15,7	254
8	Souzão	1932	8,7	314
9	»	1933	11,1	375
10	»	1934	3,8	179
11	»	1935	8,2	290
12	»	1936	9,7	264
13	»	1937	15,0	430
14	»	1939	8,0	216
15	Tinta Amarela	1932	19,5	501
16	» »	1933	15,0	269
17	» »	1934	15,0	462
18	» »	1935	9,4	319
19	» »	1936	12,4	303
20	» »	1937	30,4	554
21	» »	1939	10,1	243
22	Tinta Roriz	1932	18,0	285
23	» »	1933	12,5	409
24	» »	1934	12,0	419
25	» »	1935	8,7	271
26	» »	1936	8,2	303
27	» »	1937	14,6	398
28	» »	1939	11,0	171

QUADRO I

(Cont.)

N.º de ordem	Castas	Ano	F, mg ‰	HMF, mg ‰
29	Touriga Francesa	1932	11,3	242
30	» »	1933	7,4	227
31	» »	1934	15,1	380
32	» »	1935	8,5	298
33	» »	1936	15,1	338
34	» »	1937	11,5	314
35	» »	1939	15,0	243
36	Bastardo	1933	15,2	37
37	»	1934	5,6	0
38	»	1935	7,3	58
39	»	1936	16,2	163
40	»	1937	15,2	221
41	Tinta Francisca	1933	23,2	345
42	» »	1934	19,0	351
43	» »	1935	9,4	264
44	» »	1936	21,0	323
45	» »	1937	18,0	356
46	» »	1939	14,6	203
47	Mourisco	1934	19,2	396
48	»	1935	10,6	227
49	»	1936	19,6	308
50	»	1937	15,0	462
51	»	1939	19,4	257
52	Tinto Barroca	1935	12,6	314
53	» »	1936	10,9	319
54	» »	1937	16,4	356
55	» »	1939	12,4	251
56	Tinto Cão	1936	11,6	279
57	» »	1937	16,5	414
58	» »	1939	10,1	198

Os vinhos novos apresentam-se duma maneira completamente diferente, valores nulos de HMF e muitíssimo baixos de F, conforme o Quadro II.

Os vinhos correntes de exportação não mostram identidade de teores de F e de HMF, que são muito variáveis. Encontram-se no Quadro III.

QUADRO II

N.º de ordem	Castas	F, mg ‰	HMF, mg ‰
1	Tinto Cão	0	0
2	Touriga Nacional	0,5	0
3	Cornifesto	0,2	0
4	Mourisco de semente	0	0
5	Touriga francesa	0	0
6	Souzão	0	0
7	Tinta amarela	0,5	0
8	Moreto	0,8	0
9	Rufete	0	0
10	Tinta Carvalha	0	0
11	Tinta Barroca	0	0
12		0	0
13		0	0
14		0,1	0
15		0,2	0
16		0	0
17		0,2	0
18		0,1	0

QUADRO III

N.º de registo	F, mg ‰	HMF, mg ‰	Qualidade
30 065	0,6	58	branco
30 058	1,3	7	tawny
30 059	1,2	8	tawny
30 077	0,1	0	ruby
30 078	5,5	30	branco
30 072	0	15	tawny
30 073	0,6	0	tawny
30 079	5,5	14	branco
30 080	5,2	22	branco
30 081	0	0	tawny
30 082	5,5	10	branco
30 083	0,4	0	branco
30 084	1,2	18	branco
—	1,0	8	
30 141	0,2	0	tawny
30 142	0,2	0	branco

Em seis vinhos de consumo, não encontramos nem F nem HMF.

As aguardentes não acusam HMF, como é lógico, visto ser um composto não destilável. O F traduz-se por valores baixos.

Em relação aos mostos distinguem-se nitidamente duas categorias, a dos virgens e a dos mostos concentrados.

A evolução dos teores de HMF processa-se de acordo com as ideias actualmente estabelecidas, incluindo a condensação e polimerização deste composto.

QUADRO IV

N.º de registo	F, mg ‰	HMF, mg ‰	
89 848	0	0	Mosto virgem
89 849	0	0	» »
88 529	0,2	0	» »
88 530	0,3	0	» »
88 557	0,1	0	» »
92 062	0	0	» »
26 114	6,0	194	Mosto concentrado
81 399	9,5	760	» »
81 400	14,0	540	» »
81 415	13,5	240	» »
81 416	12,0	244	» »
89 950	3,0	62	» »
91 898	8,5	544	» »

Nos mostos virgens não encontramos HMF, enquanto que nos mostos concentrados os seus valores são bastante elevados, no que é acompanhado pelo furfural, como se pode verificar no Quadro IV.

RESUMO

No vinho, nos seus derivados em geral, assim como nos mostos, é possível a determinação do furfural e do p-hidroximetilfurfural por espectrofotometria no UV, após preparação da amostra.

Em relação ao F, a observação espectrofotométrica recai sobre o destilado da amostra alcalinizada a pH 7,5-8. Para o p-hidroximetilfurfural aproveita-se a parte residual da amostra

já convenientemente defecada pelo sulfato de cádmio a pH 8-8,5 e destilada.

Entram no cálculo os valores diferenciais da absorvência, ou D. O., a 275 e 245 m μ para o F e 282 e 245 para o HMF.

RÉSUMÉ

La spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet permet la détermination du furfural et du p-hydroxymethylfurfural dans les vins et leurs dérivés et dans les moûts.

Le dosage du F s'opère dans le distillé du vin alcalinisé à pH 7,5-8.

La lecture au spectrophotomètre s'effectue à 275 et 245 m μ ; la différence des deux densités optiques est retenue pour le calcul de la valeur du F.

Dans une autre prise on effectue la détermination du HMF, après défécation préalable au sulfate de cadmium à pH 8-8,5, et élimination du F par distillation.

La lecture spectrophotométrique s'effectue à 282 et 245 m μ et la différence des densités optiques est retenue pour le calcul du HMF.

Les lectures sont effectuées par rapport à l'eau distillée.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CUNHA RAMOS, M. & GOMES, LOURDES G.
 1966 Um método volumétrico para a determinação dos cloretos nos vinhos. *Vin. Port. Doc.*, 3(2).
 1966 Um método colorimétrico para a determinação do manganés no vinho. *Vin. Port. Doc.*, 3(3).
- LINDEMANN, E.
 1955 Die spektralphotometrische Bestimmung von Furfurol und 5-oxymethylfurfurol in Kohlenhydrathydrolysaten. *Stärke*, 7, 280-284.

DE VINEA ET VINO PORTUGALIÆ DOCUMENTA

Abrev.: *Vin. Port. Doc.*

TRABALHOS PUBLICADOS:

VOLUME IV

Série II — *ENOLOGIA*

- 1 . *Ramos, Mário da Cunha e Gomes, Lourdes Guedes* — Determinação espectrofotométrica do furfural e do p-hidroximetilfurfural.