

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RAISSA TANDARA MARIA DOS SANTOS

Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de
furfurais em cafés utilizando fotometria por imagens digitais

Piracicaba
2023

RAISSA TANDARA MARIA DOS SANTOS

Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de
furfurais em cafés utilizando fotometria por imagens digitais

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani
Rocha

Piracicaba
2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Santos, Raissa Tandara Maria dos

Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de furfurais em cafés utilizando fotometria por imagens digitais / Raissa Tandara Maria dos Santos; Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

84 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Análise fotométrica. 2. Café (Controle de qualidade). 3. Imagem digital. 4. Química analítica limpa. 5. Torrefação. I. Título.

CDU 543.48 : 633.73

Elaborada por:

Rubenildo Oliveira da Costa

CRB-8/79468

Resolução CFB N° 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico este trabalho ao meu companheiro Karlmer.
Obrigada pelo apoio, incentivo e suporte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo incentivo, apoio, companheirismo e compreensão.

Ao meu companheiro Karlmer, por estar sempre presente, me apoiando, incentivando e torcendo por mim, pelo amor, carinho, cumplicidade e paciência.

Agradeço ao Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha, por toda orientação durante esses anos de mestrado, pelo suporte, correções e incentivos. Pela confiança e por todos os ensinamentos.

Aos Professores Dra. Wanessa Melchert Mattos, Dr. Vagner Bezerra dos Santos e Dra. Ana Paula Silveira Paim, pelas contribuições dadas ao comporem a banca de qualificação desse trabalho.

À Professora Dra. Wanessa Melchert Mattos por fornecer as amostras de cafés especiais.

A todos os colegas da Química Analítica, aos que ainda estão e aos que já passaram por aqui, pelo convívio, pelas experiências compartilhadas e pelos momentos de descontração.

Ao CENA, em especial ao Laboratório de Química Analítica “*Henrique Bergamin Filho*”, por toda infraestrutura oferecida para a realização deste trabalho.

À Samara Soares pela grande ajuda durante o desenvolvimento desse projeto e por todas as correções e sugestões na redação da dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida (Processo nº 130375/2020-9) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - código de financiamento 001.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho e no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Muito obrigada a todos!

“Disciplina é liberdade
Compaixão é fortaleza
Ter bondade é ter coragem”

Renato Russo

RESUMO

SANTOS, R.T.M. **Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de furfurais em cafés utilizando fotometria por imagens digitais**. 2023. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

Os compostos derivados furânicos (e.g. furfural e 5-hidroximetilfurfural, HMF) são formados como resultado da degradação de carboidratos durante o processo de torra do café. A redução na concentração desses furanos está relacionada ao aumento do grau de torra, uma vez que são degradados em altas temperaturas. Portanto, é necessário monitorar esses compostos como parâmetros de qualidade para o café torrado e as quantidades dessas espécies têm também sido utilizadas para diferenciar cafés especiais e tradicionais, estes tipicamente submetidos a torras mais intensas. Os métodos analíticos comumente utilizados para quantificar os furanos, como o HPLC, são demorados, trabalhosos e caros. Neste estudo, foram desenvolvidos métodos analíticos simples e econômicos para a determinação de furfurais em cafés torrados, utilizando fotometria por imagens digitais. Os métodos envolveram a reação do furfural ou HMF com anilina em meio ácido, resultando em produtos de cor rosa (furfulidenanilina) e amarelo (base de Schiff), respectivamente. As reações colorimétricas e as medidas fotométricas foram realizadas diretamente em microtubos de polipropileno, sob condições de iluminação controlada. As medidas analíticas foram baseadas em imagens digitais capturadas pela câmera de um smartphone e convertidas em valores RGB por meio do aplicativo PhotoMetrix[®] 1.8. As intensidades da radiação refletida nos canais G (verde) e B (azul), correspondentes às cores complementares dos produtos da reação foram utilizados como parâmetros analíticos. As concentrações dos reagentes foram otimizadas pelo método univariado, resultando nas seguintes condições: anilina 8% (m/v) e ácido acético 80% (v/v), com tempo de reação de 5 min, para a determinação de furfural e anilina 8% (m/v) e ácido acético 30% (v/v), com tempo de reação de 10 min, para a determinação de HMF. Para a determinação de furfural, foi obtida resposta linear de 0,16–1,33 mg L⁻¹, descrita pela equação $S = (104,4 \pm 0,5) + (29,2 \pm 0,7) C$ ($r = 0,998$), com limite de detecção (LD) de 0,05 mg L⁻¹, limite de quantificação (LQ) de 0,16 mg L⁻¹ e coeficiente de variação (CV) foi de 0,48% ($n = 10$). No método para a determinação de HMF, a faixa linear foi de 30–200 mg L⁻¹, descrita pela equação $S = (50 \pm 2) + (0,18 \pm 0,01) C$ ($r = 0,994$), com LD de 10 mg L⁻¹, LQ de 33 mg L⁻¹ e CV ($n = 10$) de 0,92%. A aplicação do método para a determinação de HMF foi inviabilizada pela intensa sobreposição espectral do produto de medida com o extrato de café. O procedimento proposto para o furfural consumiu 50 mg de amostra, 1 mL de etanol e 40 mg de anilina por determinação, resultando em apenas 1,5 mL de resíduo. Os resultados obtidos para a determinação em cafés torrados foram concordantes com os obtidos pelo método de referência HPLC. Devido a essas características, bem como à portabilidade e ampla disponibilidade de smartphones, o método proposto torna-se atraente para a determinação do furfural, com o objetivo de avaliar a qualidade do café e monitorar o processo de torra.

Palavras-chave: Qualidade de cafés, Derivados furânicos, Fotometria, Imagens digitais, Química analítica limpa.

ABSTRACT

SANTOS, R.T.M. **Development of an analytical procedure for the determination of furfurals in coffee using digital image photometry**. 2023. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

Furanic compounds (*e.g.* furfural and 5-hydroxymethylfurfural, HMF) are formed as a result of carbohydrate degradation during the coffee roasting process. The reduction in the concentration of these furans is associated with an increase in the degree of roast, as they are degraded at high temperatures. Therefore, it is necessary to monitor these compounds as quality parameters for roasted coffee and the amounts of these species have also been used to differentiate specialty and traditional coffees, with the latter typically undergoing more intense roasting. The analytical methods commonly used for quantifying furans, such as HPLC, are time-consuming, labor-intensive, and expensive. In this study, simple and cost-effective analytical methods were developed for the determination of furfurals in roasted coffees using digital image photometry. The methods involved the reaction of furfural and HMF with aniline in acidic medium, resulting in pink (furfurylideneaniline) and yellow products (Schiff base), respectively. The colorimetric reactions and photometric measurements were carried out directly in polypropylene microtubes under controlled lighting conditions. The analytical measurements were based on digital images captured by a smartphone camera and converted into RGB values using the PhotoMetrix® 1.8 application. The intensities of the reflected radiation in the G (green) and B (blue) channels, corresponding to the complementary colors of the reaction products were used as analytical parameters. The reagent concentrations were optimized by the univariate method, resulting in the following conditions: aniline 8% (m/v) and acetic acid 80% (v/v), with a reaction time of 5 min, for the determination of furfural; and aniline 8% (m/v) and acetic acid 30% (v/v), with a reaction time of 10 min, for the determination of HMF. For the determination of furfural, a linear response in the range 0.16–1.33 mg L⁻¹ was obtained, described by the equation $S = (104.4 \pm 0.5) + (29.2 \pm 0.7) C$ ($r = 0.998$), with a limit of detection (LD) of 0.05 mg L⁻¹, limit of quantification (LQ) of 0.16 mg L⁻¹, and coefficient of variation (CV) of 0.48% ($n = 10$). In the method for the determination of HMF, the linear range was 30–200 mg L⁻¹, described by the equation $S = (50 \pm 2) + (0.18 \pm 0.01) C$ ($r = 0.994$), with a LD of 10 mg L⁻¹, LQ of 33 mg L⁻¹, and a CV of 0.92% ($n = 10$). The application of the method for HMF determination was hindered by the strong spectral overlap between the measurement product and the coffee extract. The proposed procedure for furfural consumed 50 mg of sample, 1 mL of ethanol, and 40 mg of aniline per determination, resulting in only 1.5 mL of waste. The results obtained for the determination in roasted coffees agreed with those obtained by the HPLC reference method. Because of these characteristics, as well as the portability and widespread availability of smartphones, the proposed method is attractive for furfural determination, aiming to evaluate coffee quality and monitor the roasting process.

Keywords: Coffee quality, Furan derivatives, Photometry, Digital Images, Green analytical chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens de cafés com torra clara, média e escura	31
Figura 2 - Representação das principais etapas da reação de Maillard, destacando a formação do hidroximetilfurfural e furfural	32
Figura 3 - Representação esquemática dos procedimentos para a determinação de furfural/HMF em café	46
Figura 4 - Sobreposição do espectro de absorção de uma solução de HMF e a faixa espectral coberta pelo canal B	48
Figura 5 - Imagem dos microtubos de polipropileno contendo diferentes proporções de solução de HMF e reagente	49
Figura 6 - Efeito da concentração de ácido acético na resposta analítica e sinal de branco	50
Figura 7 - Efeito da concentração de anilina na resposta analítica e valor de branco	51
Figura 8 - Efeito do tempo de reação na resposta analítica e no valor de branco	52
Figura 9 - Efeito do tempo de reação na resposta analítica e no valor de branco	52
Figura 10 - Imagem digital dos microtubos contendo a reação colorimétrica e curva analítica de calibração de furfural	53
Figura 11 - Imagens dos extratos de café em diferentes proporções amostra:etanol	54
Figura 12 - Espectros de absorção de extrato do café e do produto da reação entre HMF e anilina	55
Figura 13 - Sobreposição do espectro de absorção de uma solução de furfural e faixas espectrais cobertas pelos canais B e G	57
Figura 14 - Efeito do volume de reagente na resposta analítica e valor de branco.....	58
Figura 15 - Imagem digital dos microtubos contendo anilina preparada em diferentes solventes	59
Figura 16 - Efeito da concentração de ácido acético na resposta analítica e valor de branco.....	60
Figura 17 - Efeito da concentração de anilina na resposta analítica e valor de branco.....	61

Figura 18 - Efeito do tempo de reação na resposta analítica e no valor de branco.....	62
Figura 19 - Efeito do tempo de reação na resposta analítica e no valor de branco.....	63
Figura 20 - Imagem digital dos microtubos de extratos de café extraídos em diferentes etapas de extração	66
Figura 21 - Espectros de absorção UV-vis do extrato do café e espectro de absorção UV-vis da solução de furfural	67
Figura 22 - Imagem digital dos microtubos contendo a reação colorimétrica e curva analítica de calibração do furfural	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos furânicos presentes no café torrado	33
Tabela 2 - Características de análise determinação de derivados furânicos em café	37
Tabela 3 - Diferentes aplicações de colorimetria baseada em imagem digital obtidas por <i>smartphones</i>	40
Tabela 4 - Avaliação de diferentes métodos de extração de furfural	64
Tabela 5 - Avaliação do efeito da proporção massa/volume	65
Tabela 6 - Dados de linearidade da reta da curva analisada pelos por diferentes tratamentos de dados	69
Tabela 7 - Recuperações de furfural adicionado a amostras de café	70
Tabela 8 - Teores de furfural em amostras de cafés determinados pelo procedimento proposto e de referência	71
Tabela 9 - Teores de furfural das amostras de cafés determinados pelo procedimento proposto e de referência, após a correção pela absorção da amostra	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-F	–	2-furfural
ABIC	–	Associação Brasileira da Indústria do Café
AF	–	2-acetilfurano
CCD	–	Dispositivo de carga acoplada (do inglês <i>Charge-Coupled Device</i>)
CIE	–	<i>Commission Internationale l'éclairage</i>
CMYK	–	Ciano, Magenta, Amarelo e Preto (do inglês <i>Cyan, Magenta, Yellow e Key</i>)
CQI	–	<i>Coffee Quality Institute</i>
DAD	–	Detector por Arranjo de Diodos (do inglês <i>Diode Array Detector</i>)
DIP	–	Fotometria por Imagens Digitais (do inglês <i>Digital Image Photometry</i>)
FA	–	Ácido 2-furoico
FFA	–	Álcool furfurílico
FID	–	Detector de ionização de chama (do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>)
FMC	–	2-furilmetilcetona
GC-MS	–	Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (do inglês <i>Gas Chromatography- Mass Spectrometry</i>)
HMF	–	5-hidroximetilfurfural
HMFA	–	Ácido 5-hidroximetil-2-furóico
HPLC	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSV	–	Matiz, Saturação e Valor (do inglês <i>Hue, Saturation e Value</i>)
IARC	–	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
LD	–	Limite de detecção
LED	–	Diodo Emissor de Luz (do inglês <i>Light-Emitting Diode</i>)
LLE	–	Extração Líquido-Líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LPME	–	Microextração em Fase Líquida (do inglês <i>Liquid-Phase Microextraction</i>)
MAPA	–	Ministério da Agricultura e Pecuária

- MF – 5-metilfurfural
- QG – Qualidade Global
- RGB – Vermelho, Verde e Azul (do inglês *Red, Green and Blue*)
- ROI – Região de Interesse (do inglês *Region of Interest*)
- RP – Fase Reversa (do inglês *Reversed Phase*)
- SCAA – *Specialty Coffee Association of America*
- SPE – Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)
- SPME – Microextração em Fase Sólida (do inglês *Solid Phase Microextraction*)
- SR – Reação de Stenhouse
- UAE – Extração Assistida por Ultrassom (do inglês *Ultrasound Assisted Extraction*)
- UV – Região ultravioleta do espectro eletromagnético
- Vis – Região visível do espectro eletromagnético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1. Café	27
3.2. Qualidade do café especial.....	28
3.3. Torrefação e a formação de compostos furânicos em café	30
3.4. Métodos analíticos para a determinação de compostos furânicos em café.....	34
3.5. Fotometria por imagens digitais obtidas por <i>smartphone</i>	37
4. PARTE EXPERIMENTAL	43
4.1. Amostras de café	43
4.2. Reagentes e soluções	43
4.3. Equipamentos e acessórios.....	43
4.3.1. <i>Imagens digitais</i>	43
4.3.2. <i>Instrumentação padrão</i>	44
4.4. Procedimento proposto.....	45
4.4.1. <i>Extração de furfural</i>	45
4.4.2. <i>Derivatização química e medidas fotométricas</i>	45
4.5. Procedimento de referência.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Determinação de HMF	47
5.1.1. <i>Aspectos gerais</i>	47
5.1.2. <i>Otimizações</i>	49
5.1.3. <i>Características analíticas</i>	53
5.1.4. <i>Extração do HMF</i>	54
5.2. Determinação de furfural	55
5.2.1. <i>Aspectos gerais</i>	55
5.2.2. <i>Otimização</i>	59
5.2.3. <i>Extração do furfural</i>	63
5.2.4. <i>Características analíticas</i>	67
6. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da água [1]. O Brasil é o maior produtor de café do mundo, responsável por um terço da produção global, e o segundo maior consumidor da bebida [2]. Segundo o relatório do Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (Cecafé), em 2022, o Brasil atingiu o recorde histórico de receita cambial de exportações de café no valor de US\$ 9,2 bilhões, tendo exportado 39,3 milhões de sacas de 60 kg, incluindo cafés verde, torrado, moído e solúvel [3].

À medida que os consumidores se tornam cada vez mais exigentes em relação à qualidade dos produtos, o café especial tem se tornado mais popular. O café especial é uma classificação dada a grãos de café que atendem a critérios rigorosos de qualidade, incluindo origem, sabor, aroma, acidez, doçura e corpo. Esses critérios são rigorosamente avaliados para garantir que os grãos selecionados atinjam um padrão de qualidade superior [4]. O café especial tem se consolidado como a preferência dos consumidores, o que tem contribuído significativamente para agregar valor ao produto [1].

Diversos fatores influenciam as características qualitativas e sensoriais do grão de café, além de sua variedade, incluindo fatores intrínsecos como a composição química do grão, influenciada por condições genéticas, solo, clima, região e altitude, e fatores extrínsecos, como os métodos de manejo, colheita, transporte, processamento, armazenamento, moagem e torrefação [5].

A torra é um dos processos mais relevantes no desenvolvimento de aroma, cor e sabor do café. Durante a torrefação, os grãos de café sofrem diversas transformações físico-químicas, que afetam a qualidade sensorial da bebida, podendo variar conforme espécie e cultivar [6]. No processo da torra clássica, os grãos de café verde são submetidos a temperaturas entre 180–230°C, por 12 a 15 min [7], sendo que a estrutura dos grãos começa a se modificar a partir dos 50°C, devido à evaporação da água e desnaturação de proteínas. Acima de 100°C, os grãos de café sofrem escurecimento, devido à decomposição térmica e à pirólise de compostos orgânicos [8]. O grau de torra, classificado a partir do tempo e temperatura da torrefação, é normalmente avaliado qualitativamente a partir da cor, sendo classificado como café de torra clara, média ou escura [9].

O bioquímico francês Louis-Camille Maillard, em 1912, publicou seu primeiro estudo sobre a reação que passou a receber seu sobrenome [10]. Trata-se da reação química entre o grupo carbonila de um carboidrato e a função amino livre de aminoácidos, peptídeos ou proteínas [11]. Durante a torrefação do café, as condições são propícias à reação de Maillard, sendo um ambiente com elevada concentração de sacarídeos (principalmente açúcares redutores), baixo pH, devido à presença de ácidos orgânicos, baixa atividade de água e elevada temperatura [8].

Durante a torrefação do café, inclusive devido à reação de Maillard, ocorre a formação de uma ampla variedade de compostos voláteis, dentre os quais a principal família é a dos furanos. Os furanos são compostos orgânicos aromáticos heterocíclicos que contêm átomos de oxigênio em sua estrutura [11]. Os principais compostos encontrados em cafés torrados, entre os derivados de furano, são o 2-furfural (2-F) e o 5-hidroximetilfurfural (HMF) [12,13].

Os níveis de furanos no café estão correlacionados com o grau de torra, sendo que cafés com torra escura apresentam concentrações menores do que os cafés com torra branda [14], principalmente devido à instabilidade térmica e degradação durante o processo da torrefação. Assim, derivados de furano podem ser empregados como marcadores e indicadores de qualidade, identificando efeitos de aquecimento e auxiliando o monitoramento do processo de torra [15].

Devido às quantidades expressivas de derivados do furano em cafés torrados e seus prováveis efeitos toxicológicos, há a necessidade de monitorar quantitativamente esses compostos [16]. Em razão à sua volatilidade, a determinação de compostos furânicos é normalmente realizada por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) [17], usualmente após microextração em fase sólida (SPME) [18] ou microextração em fase líquida (LPME) [19]. Nos últimos anos, a técnica analítica mais utilizada para a determinação de furfural no café tem sido a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção espectrofotométrica no ultravioleta (UV) a 280 nm [20] e utilizando coluna de fase reversa (RP) [15,21,22].

Apesar das diferentes alternativas disponíveis, os métodos analíticos anteriormente citados são usualmente trabalhosos, envolvem muitas etapas, equipamentos caros e consomem quantidades elevadas de reagentes e solventes. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de procedimentos analíticos mais rápidos e práticos para a determinação de furanos em cafés.

Spot tests são ferramentas analíticas simples, rápidas e de baixo custo, que requerem quantidades reduzidas de amostras, reagentes e solventes, geralmente explorando reações colorimétricas. Os *spot tests* foram relatados pela primeira vez por Feigl, em 1966, para análises qualitativas, utilizando algumas gotas de amostras e reagentes [23,24]. Posteriormente, foram amplamente aplicados para análises quantitativas de compostos orgânicos e inorgânicos [25,26].

Recentemente, *spot tests* têm sido combinados com medições fotométricas baseadas em imagens digitais em diversos estudos e com interesse crescente pela indústria. A imagem (foto), inicialmente, era obtida por câmeras digitais [27] e digitalizada por *scanners* para interpretação dos dados, utilizando *softwares* específicos [28,29]. Atualmente, é mais usual utilizar a câmera de um *smartphone* para capturar a imagem e medida da cor da gerada através de reações colorimétricas com o analito [24,30] utilizando *softwares* gratuitos para a conversão de imagens digitais em informações analíticas como, por exemplo, valores de RGB (do inglês *Red, Green, Blue*). No sistema de cores RGB, os canais R, G e B são combinados de modo a reproduzir o espectro de cores na região visível [30]. Essa associação com *spot tests* é atraente devido ao baixo consumo de reagentes e amostras, e às imagens de alta resolução geradas pelas câmeras dos *smartphones*, com portabilidade e detectabilidade muitas vezes comparável às obtidas com espectrofotômetros convencionais [31].

A possibilidade de medições no local de processamento (*point of care*), inerente à fotometria por imagens digitais obtidas com *smartphone*, com baixo consumo de reagentes, praticidade, baixa demanda de energia e com instrumentação simples, é atrativa para análises de rotina [32,33]. Outros aspectos atrativos incluem a menor manipulação de soluções e solventes, minimizando o risco de contaminação da amostra e exposição do analista, além da baixa geração de resíduos, reduzindo impacto ao meio ambiente [32]. Vários estudos têm explorado métodos analíticos que empregam fotometria baseada em imagens digitais em diversas áreas com uma ampla gama de aplicações, incluindo o controle de qualidade de alimentos e bebidas [27,30,32]. Nesta dissertação, foi proposto o desenvolvimento de um *spot test* para monitorar compostos derivados de furano, termossensíveis, durante o processo de torrefação do café, por meio da fotometria por imagens digitais obtidas por *smartphones*.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação foi o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de furfural e HMF em cafés torrados, explorando *spot test* e fotometria por imagens digitais. Objetivou-se métodos analíticos que consumissem pequenas quantidades de reagentes e solventes e adequado para análises de rotina, incluindo o monitoramento da torra do café e como parâmetro de qualidade do café torrado. São objetivos específicos:

- (i) Definir o método analítico e otimizar os procedimentos para a determinação de furfural e HMF por fotometria com imagens digitais;
- (ii) Estabelecer as condições ótimas para a extração de furfural e HMF de amostras de café;
- (iii) Validar o procedimento desenvolvido para a determinação de furfural e HMF em amostras de cafés tradicionais e especiais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Café

O café teve origem no século IX na Etiópia e se espalhou pelo mundo através do Egito e da Europa [34]. No século XVIII, o café foi introduzido no Brasil, a partir de sementes e mudas originárias da Guiana Francesa. As primeiras plantações foram estabelecidas no Pará e a cultura do café rapidamente se espalhou pelos Estados do norte do país [35]. Em pouco tempo, a cafeicultura se espalhou por todo o território nacional, com destaque para a região sudeste, onde as zonas climáticas se mostravam mais adequadas ao cultivo. Atualmente, essa região é a principal produtora de café no país [36].

Em pouco tempo o Brasil se tornou o maior produtor de café do mundo, responsável por 70% da exportação mundial [2]. O café é uma *commodity* de extrema importância econômica, gerando riqueza e impulsionando o desenvolvimento de diversos setores no país, como agrícola e industrial [36].

O cultivo do café demonstrou grande adaptabilidade ao clima tropical, uma vez que os grãos se desenvolvem melhor em climas quentes e úmidos [37]. Devido à sua vasta extensão territorial, o Brasil apresenta uma grande diversidade de climas, relevos, altitudes, latitudes e solos, o que permite que cada região produtora de café produza diferentes tipos de grãos, resultando em bebidas de qualidade e características únicas [38].

Atualmente, mais de 100 espécies do gênero botânico *Coffea* L. (família Rubiaceae) são conhecidas mundialmente [39]. Entretanto, nem todas possuem valor econômico, apenas o café robusta (*Coffea canephora*) e o café arábica (*Coffea arabica*) são variedades produzidas e comercializadas [40], correspondendo, aproximadamente, a 30% e 70% da produção mundial de café, respectivamente [5]. Essas espécies de café se diferenciam em diversos aspectos, como composição química, qualidade dos grãos, preço de mercado e aceitação pelo consumidor [41].

O café robusta, também conhecido como conilon, é uma variedade de café com alto teor de cafeína e sólidos solúveis. Embora seja conhecido por ter um sabor mais forte e amargo que a variedade arábica, o café robusta é uma opção mais econômica para os produtores, devido à sua maior resistência a doenças, pragas e capacidade de crescer em condições menos favoráveis, resultando em uma maior produtividade e menor custo de produção [42]. O café robusta é comumente comercializado como

"café tradicional" e frequentemente utilizado na produção de café solúvel ou como base para *blends* com o café arábica [40]. É cultivado principalmente em regiões de baixa altitude, com predominância nos Estados do Espírito Santo e Rondônia e, em menor escala, em parte da Bahia e de Minas Gerais [43].

O café arábica é considerado um café de alta qualidade devido ao seu sabor e aroma suave e adocicado, que são resultantes de uma menor concentração de cafeína e uma maior quantidade de açúcares em comparação a outras variedades de café. Essa característica é uma das principais motivações para preferência do consumidor [44]. É cultivado em altitudes acima de 800 metros, predominantemente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia, Rio de Janeiro e em parte do Espírito Santo [43]. Existem diversas variedades da espécie arábica, como Mundo novo, Acaiá, Catuai vermelho e amarelo, Bourbon vermelho e amarelo [34]. Em termos visuais, as duas variedades de café apresentam diferenças distintas. Os grãos de café arábica são ovais e de cor verde clara, enquanto os grãos de café robusta têm uma forma arredondada e cor castanha [39].

3.2. Qualidade do café especial

O mercado de cafés especiais tem experimentado um crescimento significativo devido às novas tendências de consumo de café e à mudança das preferências dos consumidores. Café especial é uma classificação dada a grãos de café arábica de alta qualidade, que são cultivados em condições ideais de altitude, clima e solo. Esses cafés geralmente possuem sabores e aromas complexos e distintos, que são resultado de métodos de cultivo e processamento cuidadosos. Além disso, os cafés especiais são normalmente rastreáveis até suas fazendas de origem e geralmente possuem um preço mais elevado em relação aos cafés tradicionais [45].

A definição de café especial é muito ampla e subjetiva, portanto, é necessário estabelecer critérios objetivos e confiáveis para definir a qualidade.

Cada país produtor de café tem sua própria metodologia para avaliar a qualidade dos grãos. No entanto, as classificações da *Specialty Coffee Association of America* (SCAA) são amplamente reconhecidas como as mais adequadas para cafés especiais. Essa avaliação normalmente é realizada através da prova da xícara, onde são avaliados 10 atributos sensoriais. Com base nessa avaliação, é atribuída uma pontuação final, conhecida como "Pontuação Total", para as amostras de café [46].

Essa avaliação possibilita a classificação quanto à qualidade, uma vez que cafés que atingem uma pontuação igual ou superior a 80 pontos são considerados especiais, enquanto aqueles que pontuam abaixo de 80 são considerados não especiais. A classificação é baseada em uma prova de degustação, na qual um avaliador certificado pela *Coffee Quality Institute* (CQI), conhecido como *Q Grader* (*Arábica Quality Grader*), avalia as notas de sabor do café a partir de amostras torradas e moídas, buscando garantir uma avaliação objetiva e confiável [47]. Um avaliador treinado é capaz de identificar a diferença sensorial entre bebidas elaboradas com grãos de café especiais e bebidas elaboradas com grãos regulares. Devido aos grãos de café especiais apresentarem características sensoriais mais complexas e distintas, em comparação aos grãos regulares que tendem a ter um perfil sensorial mais simples e uniforme [17].

No Brasil, a avaliação da qualidade do café é regulamentada pela Instrução Normativa nº 8 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), de 11 de junho de 2003, que estabelece a técnica de prova da xícara como método de classificação da bebida. A avaliação da qualidade do café brasileiro ocorre em duas etapas distintas: a classificação dos tipos ou defeitos do grão e a avaliação da bebida. Além disso, o café pode ser classificado por peneira, cor, torrefação e outras características descritivas [38].

A Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC) estabeleceu, em 2004, o Programa de Qualidade do Café. Para classificar a qualidade do café, provadores treinados em laboratórios credenciados avaliam diversas características, como aroma, acidez, corpo, adstringência, fragrância do pó e amargor, atribuindo uma nota de Qualidade Global (QG) de 0 a 10. Essa nota é útil para o consumidor escolher a qualidade de café desejada, sendo os cafés classificados em três categorias: extra forte ou tradicional (QG entre 4,5 e 5,9), superior (QG entre 6,0 e 7,2) e gourmet (QG entre 7,3 e 10). Os cafés com QG inferior a 4,5 não atendem aos padrões de qualidade estabelecidos pela ABIC [48].

É notável, portanto, que a qualidade do café exerce forte influência sobre o seu valor de mercado [49] e cafés classificados como especiais são comercializados com um preço entre 20% e 25% superior ao de cafés tradicionais [1]. Em 2022, houve uma grande ascensão no mercado de café, sendo que o café especial correspondeu a 6,7 milhões de sacas, representando 17% de todo café exportado pelo Brasil. Foram realizadas transações com 145 países, sendo o Estados Unidos (20,2%) e a

Alemanha (18,2%) os países que mais importaram o café especial do Brasil [50]. Por um longo período, os cafés especiais produzidos no Brasil eram destinados exclusivamente ao mercado externo, enquanto os cafés de qualidade inferior eram consumidos internamente. Atualmente, é possível encontrar produtos de café diferenciados em cafeterias, supermercados e outros estabelecimentos [41].

3.3. Torrefação e a formação de compostos furânicos em café

A torrefação do grão de café é uma das etapas mais importantes no processo produtivo, pois é responsável pela formação de sabor, aroma, mudança de cor, alteração na textura e volume do grão. Diversos fatores podem afetar o processo de torrefação do café, como o método utilizado, características do grão como variedade e teor de umidade, etapas de manejo e processamento [5].

O processo de torrefação do café envolve três fases distintas: secagem, pirólise e resfriamento. Na etapa de secagem, os grãos são expostos a altas temperaturas para acelerar a evaporação da água, presente nos grãos verdes de 8% a 13%, para uma redução de umidade final nos grãos torrados de 1,5% a 3,5%. Isso torna a torração mais uniforme, evita o estouro dos grãos e permite que o calor seja distribuído de maneira mais homogênea; nesta etapa o café passa da cor verde ao amarelo. Durante a fase da pirólise, ocorre a exposição dos grãos a altas temperaturas, entre 180°C e 230°C, que provoca a decomposição térmica de compostos orgânicos. Nessa fase ocorre a liberação de produtos voláteis (água, CO₂, CO), resultando na expansão volumétrica dos grãos de café. Isso ocorre devido à pressão gerada pela evaporação da umidade residual dos grãos crus e pela formação de gases durante o processo. As mudanças na microestrutura celular e nos componentes poliméricos dos grãos contribuem para essa expansão, tornando a parede celular menos resistente. A quebra de moléculas de açúcares, proteínas e ácidos orgânicos (e.g. ácido clorogênico) gera compostos como aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, lactonas e outros que contribuem para o sabor, aroma e coloração marrom característico do café torrado. Após atingirem a cor desejada, os grãos de café passam pela fase final da torrefação, sendo imediatamente resfriados por meio do ar ambiente ou por água, que pode ser injetada na câmara de torração. Esse resfriamento é crucial para interromper as reações de pirólise [8,51].

Durante o processo de torra do café, ocorrem simultaneamente a caramelização e a reação de Maillard, que alteram a cor e o sabor dos grãos, resultando em mudanças significativas nas suas características físicas e químicas [11]. O tempo e a temperatura empregados no processo de torrefação podem influenciar significativamente no grau de escurecimento dos grãos, que pode ser monitorado pela cor, sabor e aroma desenvolvidos, perda de massa ou pelas alterações químicas observadas [42]. Na avaliação da torra pela cor, é comum utilizar três níveis: torra clara, torra média e torra escura (Figura 1). Cafés com torra clara apresentam um sabor suave e ácido, com os grãos mantendo sua cor clara original, sendo indicada para cafés especiais. A torra média gera grãos com um sabor equilibrado e encorpado, com torra por um pouco mais de tempo, resultando em coloração mais escura e aroma mais pronunciado. Já a torra escura é a mais intensa, gerando cafés com sabor forte e aroma pronunciado; os grãos são torrados por mais tempo, resultando em coloração escura e, às vezes, com uma leve oleosidade na superfície. Esse tipo de torra é comum em cafés expressos e *blends* [9]. Os níveis de torra mencionados podem ser ajustados de acordo com as preferências dos consumidores e as características dos grãos de café utilizados.

Figura 1 - Níveis de torra do café (a) torra clara, (b) torra média e (c) torra escura

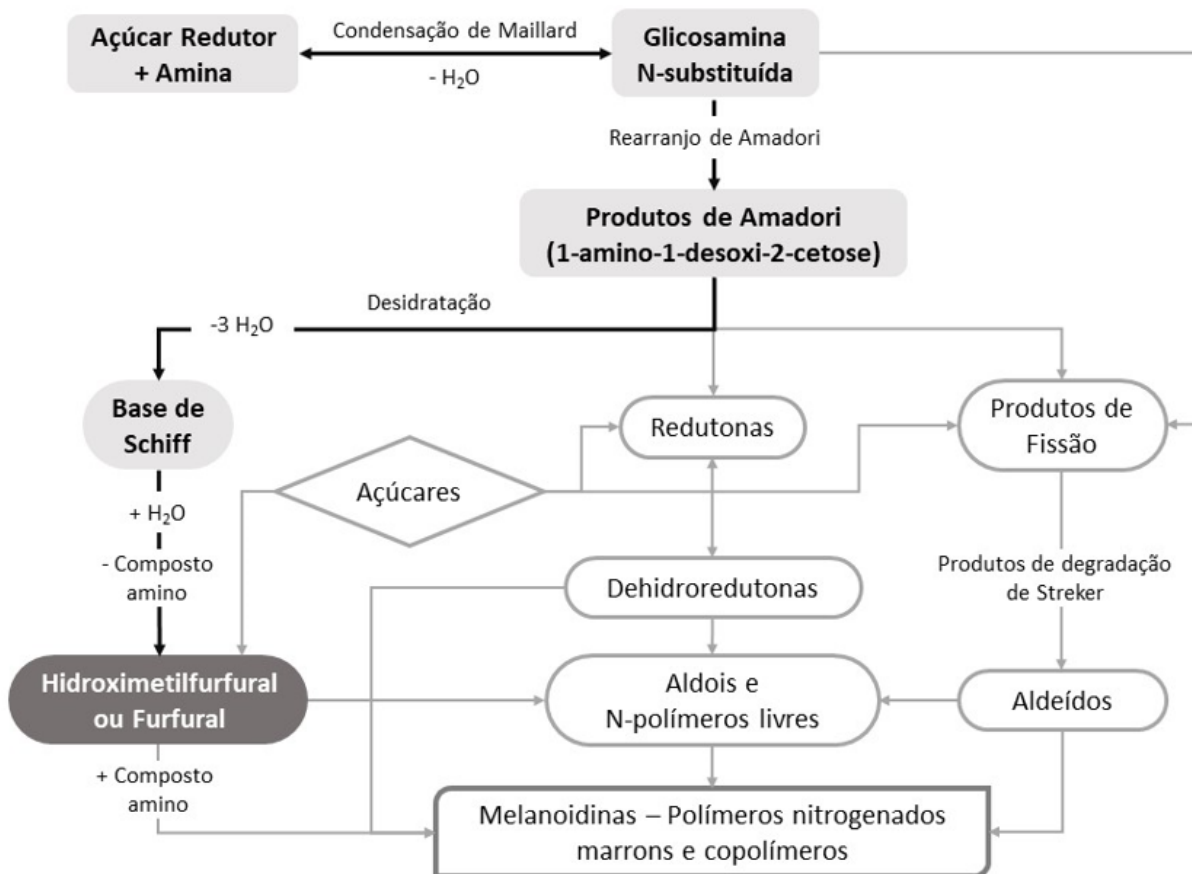


Fonte: www.starbucks.com.br/cafe/torra

Dentre as diversas reações químicas que ocorrem durante o processo de torrefação, a reação de Maillard, também conhecida como escurecimento não enzimático, é a reação que mais impacta nas propriedades sensoriais e nutricionais do café. Essa reação é caracterizada por uma complexa cascata de reações, que pode ser dividida em três estágios: estágio inicial, intermediário e final [11]. No estágio inicial, ocorre a condensação do grupo carbonila do açúcar redutor e um grupamento amino livre, formando um composto intermediário chamado de glicosilamina. Em seguida, ocorre um rearranjo molecular que resulta na formação de um produto

intermediário mais estável, chamado de produto de Amadori, que não possui cor ou absorção no ultravioleta [52]. No estágio intermediário, com o prolongamento do aquecimento, os produtos de Amadori desidratam, formando uma imina ou uma base de Schiff altamente reativa. Nessa etapa intermediária, surgem compostos dicarbonílicos, redutonas, derivados de furfural e produtos da degradação de Strecker. Esses compostos têm a capacidade de absorver radiação na região ultravioleta e alguns são fluorescentes [11,52]. No estágio final, ocorre a formação de compostos heterocíclicos de alto peso molecular, aromas característicos e pigmentos marrons. Entre esses compostos, destacam-se as melanoidinas, polímeros complexos resultantes da condensação de compostos intermediários altamente reativos, como as bases de Schiff e as enolimas. As melanoidinas são responsáveis pela coloração marrom dos alimentos, especialmente daqueles que são submetidos a altas temperaturas [13,41]. As principais etapas da reação de Maillard nos alimentos pode ser visualizada na Figura 2, enfatizando a formação do HMF e furfural.

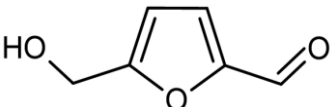
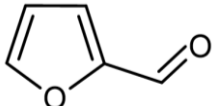
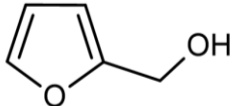
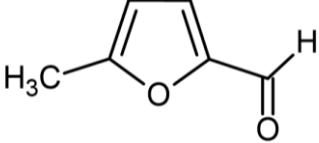
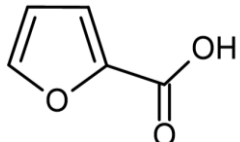
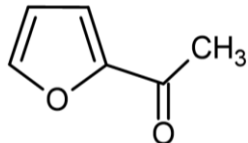
Figura 2 - Representação das principais etapas da reação de Maillard, destacando a formação do hidroximetilfurfural e furfural.



Fonte: adaptada de Francisquini *et al.* (2017) [11].

O café apresenta uma matriz extremamente complexa em relação ao seu aroma, contendo em torno de mil compostos voláteis. Além de ampliar as concentrações de compostos presentes nos grãos crus, a torrefação também favorece a formação de novos compostos voláteis, sendo os furanos a família predominante, seguida por pirróis, tiazóis, tiofenos, pirazinas e piridinas [12]. Os furanos são uma classe de compostos heterocíclicos amplamente encontrados no café torrado, sendo que aproximadamente cem tipos diferentes de furanos foram identificados nessa bebida. São compostos que possuem estrutura molecular característica, constituída por quatro átomos de carbono e um átomo de oxigênio. São líquidos lipossolúveis com alta volatilidade, ponto de ebulição usualmente $< 32\text{ }^{\circ}\text{C}$. Possuem várias funções químicas, incluindo aldeídos, cetonas, ésteres, álcoois, éteres e ácidos [11]. A Tabela 1 apresenta alguns dos compostos furânicos mais significativos encontrados no café após a torra, como o HMF, 2-furfural (2-F), álcool furfurílico (FFA), 5-metilfurfural (MF), ácido 2-furoico (FA) e 2-acetilfurano (AF) [18].

Tabela 1 - Compostos furânicos presentes no café torrado.

Composto	Sinônimo (Número CAS)	Estrutura Química
Hidroxiacetilfurfural $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	5-(hidroximetil)-2-furaldeído (67-47-0)	
Furfural $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$	2-furaldeído (98-01-1)	
Álcool Furfurílico $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$	2-furilmetanol (98-00-0)	
Metilfurfural $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	5-metilfuran-2-carbaldeído (620-02-0)	
Ácido Furoico $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_3$	Ácido 2-furancarboxílico (88-14-2)	
Acetilfurano $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	1-(furan-2-il)etanona (1192-62-7)	

Dentre os derivados de furano, o 2-furfural e o 5-hidroximetilfurfural são os principais compostos encontrados em cafés torrados, com concentrações que variam de 55 a 760 mg kg⁻¹ [12] e 350 a 2550 mg kg⁻¹ [16], respectivamente.

Os compostos furânicos são considerados indicadores de qualidade térmica do café, pois são formados e podem ser decompostos durante o processo de torrefação, assim, sua concentração está correlacionada ao grau de torra [14]. A presença desses compostos em níveis adequados é desejável, pois contribuem para as características sensoriais do café. Foi demonstrado que o aquecimento moderado (torras clara e média) aumentou as concentrações de furfural [15] e de HMF, enquanto altas temperaturas (torra escura) promoveram sua degradação [53]. Observou-se também que compostos furânicos estão presentes em maior quantidade no café especial torrado e a ausência nos cafés tradicionais indica que eles foram submetidos a uma torrefação intensa, o que levou à degradação desses compostos e à perda de características sensoriais do café [54]. Assim, furfural e HMF podem também ser usados como indicadores indiretos de qualidade, para distinguir entre cafés especiais e tradicionais, identificando os efeitos do aquecimento e auxiliando no monitoramento do processo de torra [15,54].

O furano e diversos de seus derivados são comprovadamente tóxicos e considerados potencialmente cancerígenos, quando há a exposição a altas concentrações desses compostos. No entanto, os níveis de furanos usuais em café são considerados seguros para consumo humano, desde que dentro dos limites regulamentados pelas agências de saúde [16]. O *International Agency for Research on Cancer* (IARC) considerou o furfural como “não classificável quanto à sua carcinogenicidade” (Grupo 3) e classificou o HMF como “possivelmente carcinogênico” (Grupo 2B) para os seres humanos. Essas classificações foram baseadas em evidências limitadas provenientes de estudos em animais, entretanto, não há evidências suficientes para estabelecer os efeitos citotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos dessas substâncias em seres humanos [55].

3.4. Métodos analíticos para a determinação de compostos furânicos em café

Os compostos furânicos são caracterizados por possuírem baixo peso molecular e alta volatilidade. Por essa razão, as análises de café para a determinação de furfurais são frequentemente realizadas por meio de GC-MS [56], geralmente após

extração usando técnicas como a SPME [18], LPME [19] ou a extração líquido-líquido (LLE) [57].

A SPME é uma técnica de extração de compostos voláteis ou semivoláteis de uma amostra, que utiliza uma fibra revestida com uma fase sólida. Durante o processo, a fibra é exposta ao *headspace* da amostra, permitindo que os componentes voláteis sejam adsorvidos no revestimento da fibra. Geralmente, a SPME é conduzida sob temperatura controlada para garantir a estabilidade dos compostos [58] e a reprodutibilidade do processo de extração. A LPME é uma técnica que utiliza uma fase líquida para extrair compostos de uma amostra. Uma pequena quantidade de fase extratora líquida é misturada com a amostra em uma solução aquosa e agitada, permitindo que os compostos sejam transferidos para a fase extratora. Após a extração, a fase extratora é recuperada e os compostos são separados e identificados [59]. A LLE é uma técnica de extração clássica que consiste em transferir o analito de uma fase líquida para outra, com base nas diferenças de solubilidade das espécies nas duas fases. Para isso, a amostra é misturada com uma segunda fase líquida imiscível com a primeira. Após a extração, as duas fases são separadas e os compostos são recuperados da fase líquida final [60].

Durante a injeção de amostras em sistemas de GC, o aquecimento pode levar à alteração da composição dos compostos voláteis, resultando na formação de artefatos ou alterando as quantidades reais desses derivados. Por exemplo, foi relatada a formação de furano na fibra de SPME a partir de precursores voláteis, como 2-butenal e furfural, durante o processo de dessorção térmica [56]. O HPLC tem sido explorado alternativamente à GC para a separação e detecção de furfurais [60].

O HPLC é um método amplamente utilizado para a separação dos compostos derivados do furano. Uma das vantagens desse método é que ele evita a necessidade de aplicar tratamentos térmicos nas amostras [16]. Um método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) foi desenvolvido para quantificar ácidos clorogênicos, derivados de furano e cafeína em cafés [22]. Os resultados para HMF e 2-F mostraram coeficiente de variação (CV) de 0,52% e 0,62%, respectivamente, indicando uma boa precisão, com boas recuperações dos analitos: na faixa de 85%–104% para HMF e 87%–103% para 2-F. Uma alternativa adicional para a determinação de furfurais é alcançada através de um método que combina a eficiência de separação do HPLC com a sensibilidade e especificidade proporcionadas pela combinação de biossensores com a detecção

eletroquímica. Esse método foi utilizado para determinar HMF e 2-F em amostras de café. A precisão foi avaliada através dos coeficientes de variação (CV), os quais foram de 2,0% para HMF e 1,1% para 2-F. As recuperações para ambos os analitos variaram de 93% a 102% [61]. Outro método comumente utilizado para a determinação de furanos é o HPLC-UV. Ele foi utilizado para avaliar o grau de torrefação de cafés comerciais, analisando vários derivados furânicos, como HMF e 2-F, com detecção em 280 nm. Os resultados obtidos demonstraram recuperações de 105-108% para HMF e 106-108% para 2-F, com coeficiente de variação (CV) de 2,0% e 1,5%, respectivamente [21].

No entanto, ao utilizar HPLC para determinar furfural em amostras complexas, como café, a detecção direta pode apresentar desafios em termos de seletividade e sensibilidade. Isso se deve à baixa absorção no UV e à natureza hidrofílica dos furfurais. Uma alternativa viável é realizar uma etapa de derivatização adequada antes de utilizar a detecção por HPLC-UV [62]. No entanto, os métodos analíticos mencionados anteriormente costumam ser complexos, envolvendo várias etapas, a utilização de equipamentos caros e a necessidade de quantidades significativas de reagentes e solventes. Além disso, esses métodos exigem habilidades técnicas do operador e o processo de preparação da amostra é demorado, com longos tempos de extração. Uma limitação adicional desses procedimentos é a dificuldade para análises *in situ*, o que é relevante quando se considera monitorar o processo de torra do café. A Tabela 2 mostra algumas características de métodos analíticos para a determinação de derivados furânicos em café.

Tabela 2 - Características analíticas de métodos cromatográficos para a determinação de derivados furânicos em café.

Analito	Técnica Analítica	Forma de Extração	Tempo de análise (min)	Concentração (mg kg ⁻¹)	Ref.
HMF HMFA	HPLC-UV	SPE	10	0,35-0,90 0,14-0,15	[13]
2-F HMF	HPLC-DAD	LLE	15	110-760 350-2550	[16]
Furanos	GC-MS	LPME	15	1,37-6,23	[19]
HMF HMFA 2-F MF FMC FA	HPLC-UV	LLE	13	77,7-322 73,3-158 109-200 157-209 12,3-32,8 137-205	[21]
HMF	HPLC-UV	SPE	30	900-1200	[54]
Furfural	GC-FID	LLE	1	4-11	[57]
HMF 2-F	HPLC- biossensor	Infusão	20	209-606 70-160	[61]

DAD: Detecção por Arranjo de Diodos; FA: Ácido 2-furóico; FID: Detector de Ionização de chama; FMC: 2-furilmetilcetona; GC: Cromatografia Gasosa; HMF: 5-hidroximetilfurfural; HMFA: Ácido 5-hidroximetil-2-furóico; HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; LLE: Extração Líquido-Líquido; LPME: Microextração em Fase Líquida; MF: 5-metilfurfural; MS: Espectrometria de Massa; SPE: Extração em Fase Sólida; UV: Espectrofotometria no Ultravioleta; 2-F: Furfural.

3.5. Fotometria por imagens digitais obtidas por *smartphone*

As análises colorimétricas são utilizadas na química analítica há mais de um século para fins qualitativos e quantitativos. Essa técnica é baseada na interação da radiação visível com uma substância colorida em um solvente ou substrato sólido [63], sendo a medição baseada na atenuação do feixe de radiação nos comprimentos de onda absorvidos pela amostra. Quando a luz branca incide sobre um objeto, uma parte pode ser absorvida e o restante é transmitido, refletido ou espalhado, dependendo da amostra e transparência do suporte/recipiente. A radiação transmitida/refletida pela amostra nos comprimentos de onda em que ocorre a absorção de radiação pode ser explorada para fins analíticos [64]. Os modos de detecção mais comuns, por transmissão ou reflexão, requerem uma fonte de luz, um detector e, em alguns casos, um monocromador [63].

Dispositivos analíticos menores e portáteis têm sido desenvolvidos para a detecção fotométrica, como os *spot tests* que utilizam reações colorimétricas em papel [23]. Esses *spot tests* podem ser utilizados para detectar compostos específicos de forma qualitativa, semi-quantitativa e quantitativa [24-26] e têm sido amplamente empregados para a detecção de adulterações, contaminantes e aditivos alimentares [30,32].

A técnica de *spot test* comumente utiliza medições de reflectância difusa para análise de amostras [23]. Esse método é baseado na interação de um feixe de luz com a amostra e na detecção da quantidade de luz remanescente (não absorvida) que é espalhada na superfície em diferentes direções. O valor da reflectância difusa é influenciado pelas propriedades da amostra, como sua composição química, morfologia e superfície. A medição da reflectância difusa é usualmente empregada para quantificar a concentração de um analito na amostra, com base na intensidade da cor gerada pela reação com um reagente específico [65].

Spot tests têm sido combinados a medições fotométricas baseadas em imagem digital (DIP) em vários estudos [24,27,30,32]. As medições analíticas são baseadas na aquisição de imagens usando dispositivos eletrônicos, como câmeras digitais [27,31,66], *webcams* [67], *scanners* [28,68] e, principalmente, *smartphones* [30,32,69]. Os *smartphones* evoluíram rapidamente em termos de *hardware* e *software*, apresentando hoje memórias internas de alta capacidade, câmeras de alta resolução e conectividade sem fio, tornando-se equiparáveis aos microcomputadores [63]. Assim, os *smartphones* têm sido amplamente utilizados em análises fotométricas e armazenamento/processamento de dados [64]. Vários aplicativos de acesso livre são disponíveis em sistemas operacionais como Android e iOS (e.g. PhotoMetrix® e ColorGrab®), bem como *softwares* específicos (e.g. ImageJ®), para a conversão das imagens em canais de cores utilizados como informações analíticas [29].

A imagem digital capturada é dividida em uma matriz bidimensional de elementos sensores chamados *pixels*. Para representar o valor desses pixels, são utilizados os sistemas de cores [63]. O sistema mais comumente utilizado em aplicações analíticas é o RGB (Vermelho, Verde e Azul do inglês *Red, Green, Blue*), que é um modelo de cores aditivo amplamente utilizado em dispositivos eletrônicos. O *International Color Consortium* estabeleceu um padrão de espaço de cores para o sistema RGB, em que a intensidade de cada cor (R, G ou B) é definida em uma escala de 0 a 255 (8 *bits*). A combinação desses valores é utilizada para gerar cores

secundárias, sendo que a ausência total de luz ($R = 0$, $G = 0$ e $B = 0$) é o preto puro, e a combinação máxima das três cores ($R = 255$, $G = 255$ e $B = 255$) é o branco puro [69]. Outros sistemas de cores incluem o CMYK (Ciano, Magenta, Amarelo e Preto do inglês *Cyan, Magenta, Yellow and Key*), que é um modelo de cor subtrativo amplamente utilizado em impressões, o sistema HSV, que descreve uma cor por meio de três componentes diferentes, matiz (H), saturação (S) e valor (V) [64] e o espaço de cores CIE Lab, que é utilizado para descrever cores através das coordenadas de luminância (L^*), e medidas de mudança de cor nos eixos vermelho-verde (a^*) e amarelo-azul (b^*) [63].

Diversos parâmetros impactam significativamente a captura de imagens digitais, afetando sua qualidade e utilidade para análises. Um deles é a distância entre a câmera e o objeto a ser fotografado (distância de captura). Esta variável impacta diretamente o foco da imagem, bem como a sensibilidade, a resposta linear e a precisão dos resultados obtidos [70]. As condições de iluminação também interferem na qualidade das imagens. Sendo que a falta de iluminação adequada prejudica a sensibilidade, precisão e linearidade, enquanto um excesso de iluminação pode dificultar a detecção de variações sutis de cor, afetando a sensibilidade [71].

A abertura da lente é outro parâmetro relevante, uma vez que as medições se baseiam na intensidade da radiação refletida. Assim, uma câmera com uma abertura de lente maior oferece maior sensibilidade [72]. Outra variável a considerar é a Região de Interesse (ROI). A amplitude da faixa linear e a precisão podem ser afetadas pelos valores definidos para a ROI em sistemas heterogêneos. No entanto, para sistemas homogêneos, essa consideração não é de grande importância para a maioria das aplicações [73]. Portanto, é necessário capturar as imagens do analito sob condições de iluminação controlada e considerando os parâmetros mencionados, a fim de assegurar a obtenção de resultados precisos e confiáveis, adaptando-os às exigências específicas de cada aplicação.

Com o passar do tempo, as câmeras fotográficas perderam espaço na captura de imagens digitais devido a questões relacionadas à transferência de fotografias para o computador e à integração com sistemas de análise. Em contrapartida, o uso de *smartphones* como detectores para a captura de imagens tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Esse recurso tem sido amplamente explorado no desenvolvimento de métodos analíticos fotométricos em diversas áreas de aplicação, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Diferentes aplicações de colorimetria baseada em imagem digital obtidas por smartphones.

Amostra	Analito/ parâmetro	Faixa de detecção	Tempo de análise (min)	Aparelho <i>Smartphone</i>	Tratamento de imagem	Canal de Medida	Ref.
Biodiesel	Índice de iodo	10-106 g/100 g	5	Motorola Moto X	Photometrix	R	[24]
Leite	Surfactantes aniônicos	10-50 mg L ⁻¹	15	Motorola Moto G4 Plus	Color Grab	R	[32]
Leite	Proteína	0,03- 0,30 g kg ⁻¹	40	Iphone XR	Photometrix	G	[74]
Amêndoa	β-glicosidase	0,25- 5,00 U/mL	30	Xiaomi Redmi K40	Adobe Photoshop	R-G-B	[75]
Água	Íons mercúrio	1-4 μg L ⁻¹	NE	Xiaomi Redmi Note 3 Pro	MATLAB	R-G-B	[76]
Saliva	Ácido úrico	25-150 μmol L ⁻¹	10	Iphone SE	Photometrix	G	[77]
Água potável	Cloro livre	0,6-2,5 mg L ⁻¹	1.8	Motorola Moto X4	Color Grab	G-B	[78]
Leite	Formaldeído	125- 1250 μg L ⁻¹	35	LG K10 Pro	Color Grab	G	[79]
Cachaça	Açúcares reduzidos	0,1-15,0 g L ⁻¹	10	Asus Zenfone 3	Color Grab	B	[80]
Leite	Peróxido de hidrogênio	2,5-25,0 mg L ⁻¹	2	Motorola Moto X	Color Grab	G	[81]
Frutas nativas	Ácido ascórbico	3,3-30 μmol L ⁻¹	20	Samsung Galaxy S4 Mini	ImageJ	R-G-B	[82]

NE = Não especificado; RGB = Vermelho, Verde e Azul.

Em um estudo realizado em 2017, Franco *et al.* [30] elaboraram um procedimento analítico para a determinação de furfural em amostras de cachaça. A abordagem adotada fundamentou-se na reação colorimétrica entre o furfural e a anilina em meio ácido. A reação foi conduzida diretamente nas cavidades de uma placa de porcelana. Para adquirir imagens digitais, empregou-se um sensor CCD (*Charge-Coupled Device*) de um *smartphone* em um ambiente com iluminação controlada. A análise de imagem foi conduzida utilizando o canal G (do sistema RGB). Os resultados obtidos permitiram uma análise semiquantitativa com base na triagem por gradiente de cores.

Sob condições otimizadas, o método apresentou resposta linear de 1,67–10,0 mg/100 mL ($r = 0,998$), com limites de detecção e quantificação de 0,34 e 1,15 mg/100 mL, respectivamente. A recuperação de furfural variou de 85,7% a 106%. Os resultados obtidos pelo método analítico proposto foram comparáveis aos obtidos pelo método espectrofotométrico, com um nível de confiança de 95%. O método demonstrou ser preciso, rápido e reproduzível, gerando baixa quantidade de resíduos (600 μ L), o que o torna uma ferramenta analítica útil para laboratórios com recursos financeiros limitados.

Embora tenha um grande potencial de aplicação, não foram identificados *spot tests* com DIP para fins de controle de qualidade e avaliação de amostras de café. Essa lacuna na literatura motivou a realização do presente trabalho de mestrado.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade > 18,2 MΩ cm a 25 °C), etanol anidro (≥ 99,5% etanol, Merck, Alemanha) e reagentes de grau analítico.

4.1. Amostras de café

Amostras de grãos de café especial torrados (*Coffea arabica*) foram adquiridas de produtores da Região do Circuito das Águas Paulista (São Paulo, Brasil). As amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4°C e estabilizadas à temperatura ambiente antes das análises.

4.2. Reagentes e soluções

Soluções estoque de furfural 6,24 mmol L⁻¹ e HMF 4,75 mmol L⁻¹ foram preparadas por dissolução dos padrões (Sigma-Aldrich®, EUA) em etanol. Essas soluções foram preparadas semanalmente e armazenadas sob refrigeração a 4°C. Soluções de referência nas faixas de 0,16 a 1,33 mg L⁻¹ furfural e 30 a 200 mg L⁻¹ HMF foram preparadas por diluição das soluções estoque em etanol. As soluções de anilina 8,0% (m/v) foram preparadas diariamente por dissolução do reagente Sigma-Aldrich® em 80% (v/v) de ácido acético (Quimex, Brasil) para a determinação de furfural e 30% (v/v) de ácido acético para a determinação de HMF. As soluções dos reagentes foram avolumadas com etanol anidro.

4.3. Equipamentos e acessórios

4.3.1. *Imagens digitais*

A derivatização do analito e as medidas fotométricas foram realizadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, transparentes e incolores, com fundo cônico (Axygen®, MCT-150-C), enquanto as extrações foram realizadas em tubos tipo Falcon® de 15 mL. Um *smartphone* Apple (modelo iPhone XR, câmera de 12 *megapixels* com resolução de 4608 × 2592 *pixels* e abertura de lente de *f/1,8*, equipado com o sistema operacional iOS 16) foi utilizado para capturar as imagens

digitais. Uma câmara de medida foi construída com uma caixa de isopor (180 × 200 × 140 mm de altura, comprimento e largura, respectivamente), revestida internamente com folhas de papel branco para dispersar a radiação incidente. O interior da caixa teve iluminação controlada e constante, proveniente de uma lâmpada de emergência com 30 LEDs brancos (Intelbras, 2 W) posicionada na parte inferior interna da caixa.

Um suporte foi adaptado no próprio laboratório para posicionar a câmera do *smartphone* a 6,0 cm de distância dos microtubos de polipropileno. Os microtubos foram inseridos na parte superior da caixa, com um suporte feito de Teflon[®] que serviu para manter os microtubos fixos na mesma posição dentro da caixa, garantindo que as medições fossem realizadas no centro dos microtubos. A área de captura de cada imagem (região de interesse, ROI) foi de 32 × 32 *pixels*. As imagens digitais foram convertidas em valores RGB usando o aplicativo PhotoMetrix[®] (versão 1.8, 2018) [83] e, posteriormente, os dados foram transferidos e processados no *software* OriginPro[®] (versão 9.0, 2012).

4.3.2. Instrumentação padrão

Durante a preparação dos extratos das amostras, foi utilizado um banho de ultrassom (modelo Q335D, Quimis[®]) operando a uma frequência de 40 kHz e potência de 135 W para extrair o analito. Para separar as fases, foi empregada uma centrífuga (modelo 6222T108, Quimis[®]). Além disso, um agitador vortex (modelo MSV-3500, Biosan) foi usado para misturar a amostra com o reagente. Para aquisição dos espectros de absorção e avaliação de possíveis efeitos de matriz, foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis multicanal (USB4000, Ocean Optics) equipado com uma cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

As análises do método de referência foram realizadas utilizando sistema HPLC Shimadzu Prominence LC-20A (Kyoto, Japão), utilizando uma coluna C18 Shim-pack VP-ODS (4,6 × 150 mm, partículas de 5 µm). Equipado com uma bomba quaternária LC-20AT, um forno de coluna CTO-20A operando a 40°C, um amostrador automático SIL-20A e um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A com uma célula de fluxo de 8 µL. Os dados foram adquiridos e processados utilizando o *software* Chrom Perfect versão 5.93.

4.4. Procedimento proposto

4.4.1. *Extração de furfural*

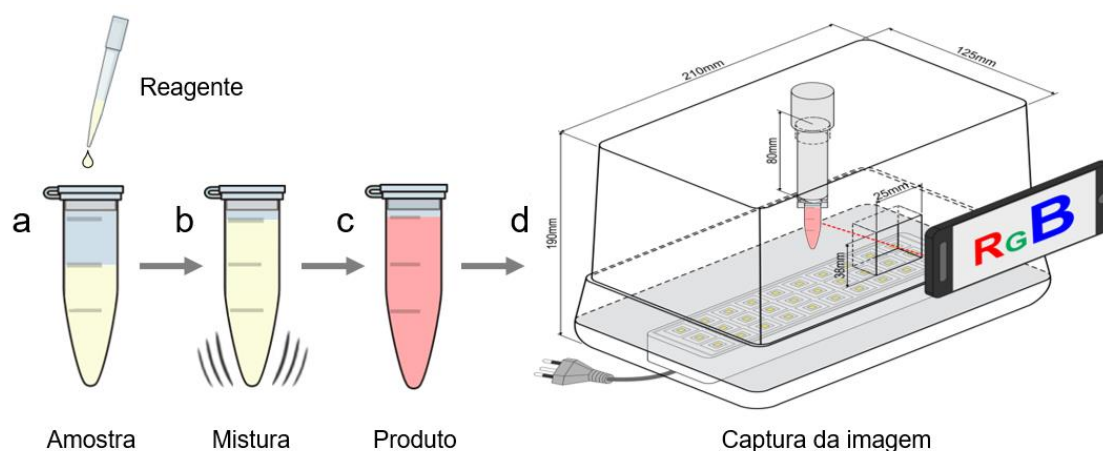
Os extratos foram preparados a partir de 0,1 g de amostra de café moído em 2 mL de etanol, extraídos em processo assistido por ultrassom (5 min). As misturas foram posteriormente centrifugadas por 10 min a 10000 rpm e filtradas em papel de filtro convencional. Os sobrenadantes foram utilizados nas determinações pelo método proposto.

4.4.2. *Derivatização química e medidas fotométricas*

Nos microtubos de 1,5 mL, foi adicionado 1000 μ L das soluções de referência ou do extrato da amostra e 500 μ L da solução de anilina 8,0% (m/v) (em ácido acético 80% (v/v) para a determinação de furfural e 30% (v/v) para a determinação de HMF, seguida de agitação em vórtex em temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Após 5 min (para o furfural) e 10 min (para o HMF) de reação as medidas analíticas foram feitas diretamente dos microtubos de polipropileno (Figura 3).

As medidas fotométricas foram realizadas sob iluminação controlada com a câmera do *smartphone* nas condições descritas no item 4.3 e baseadas nas intensidades de radiação refletida. As intensidades foram convertidas em valores RGB e os canais G e B foram utilizados para as determinações de furfural e HMF, respectivamente. Os sinais analíticos foram processados utilizando a subtração dos valores medidos de 255 (valor correspondente à reflexão total de radiação). As medições foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Figura 3 - Representação esquemática do procedimento para a determinação de furfural/HMF em café. (a) Reação com anilina em meio ácido (método de Hewitt); (b) Mistura e tempo de reação; (c) Formação do produto; (d) Aparelho para aquisição de imagens digitais por câmera de *smartphone* em condições de iluminação controladas.



4.5. Procedimento de referência

Para avaliar a precisão do método proposto, adotou-se o procedimento de referência para a determinação de furfural, baseado em HPLC-UV [22], com algumas adaptações.

A separação cromatográfica foi conduzida utilizando uma coluna C18 à temperatura ambiente, com detecção espectrofotométrica em 280 nm. O processo de eluição ocorreu com um gradiente de ácido acético 0,2% v/v em água (A) e metanol (B), seguindo o seguinte programa: 0 min: 7,5% B, 0–5 min: 20% B, 5–10 min: 20% B e 10–20 min: 7,5% B. A vazão de eluente utilizada foi de 1,0 mL min⁻¹, e o volume injetado foi de 20 µL.

Para a determinação pelo método de referência, os extratos foram preparados a partir de 0,1 g de café moído e 2 mL de etanol anidro, com agitação em vórtex por 5 min em temperatura ambiente (25 ± 1 °C). As misturas foram posteriormente filtradas em microfiltro de 0,45 µm e 250 µL e cada extrato foi diluído em 750 µL de água ultrapura.

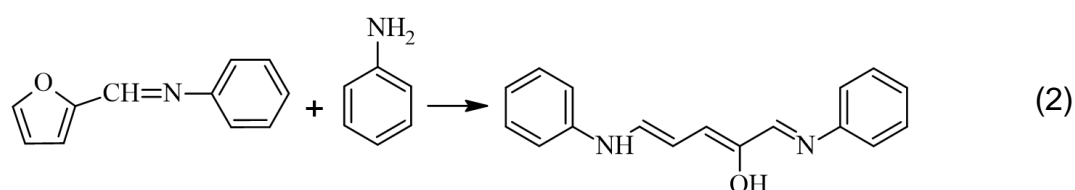
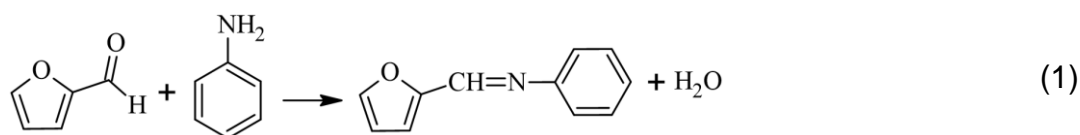
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de HMF

5.1.1. Aspectos gerais

O método proposto para a determinação de HMF em café foi baseado no método de Hewitt, que envolve a reação entre a anilina e furfural em meio ácido, gerando um composto rosa [84].

Essa reação ocorre em duas etapas. Na primeira etapa (Equação 1), ocorre a formação de uma base de Schiff pela reação de condensação entre uma amina primária (-NH₂, anilina na Eq. 1) e um aldeído (-C=O, furfural, na Eq. 1). Essa reação produz uma ligação imina (C=N-) e elimina uma molécula de água (H₂O), gerando um composto intermediário de cor amarela. Na segunda etapa, que ocorre o método para a determinação de furfural (Equação 2), ocorre a reação de Stenhouse, na qual o composto intermediário reage com uma segunda molécula de amina, o composto gerado sofre a clivagem hidrolítica, produzindo um diol, que pode se tautomerizar para formar um dial. O produto resultante final (rosa) contém uma ligação imina e dois grupos anil. Reações análogas têm sido utilizadas em testes colorimétricos para determinar aldeídos em solução [23].

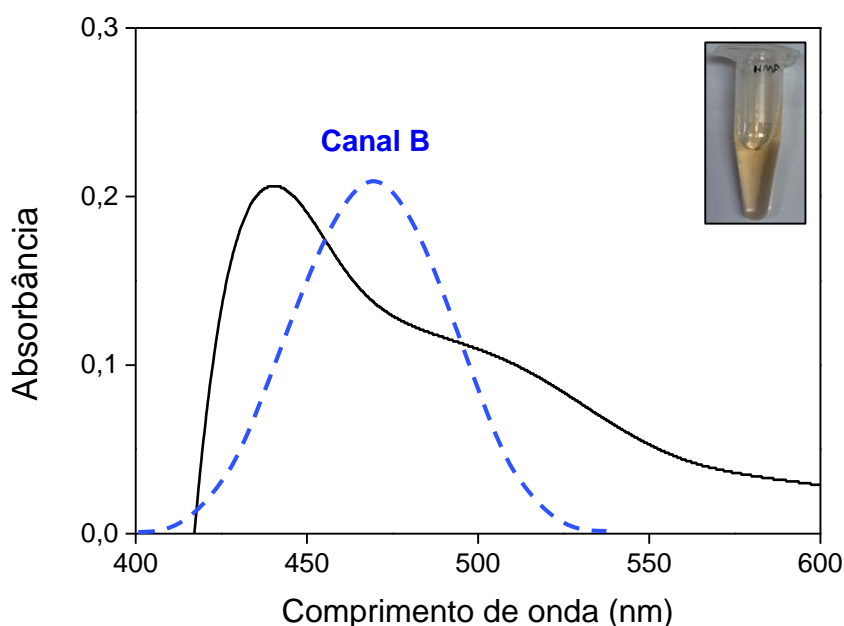


A estratégia de abertura do anel furano após a condensação do aldeído e amina é empregada para identificar o furfural e seus derivados, como metilpentoses e hexoses, em produtos alimentares, devido à intensa coloração resultante da estrutura trieno conjugada, produto conhecido como furfuralideneanilina [85]. A hipótese inicial era que o HMF, um composto químico semelhante ao furfural, produziria um produto análogo à furfuralideneanilina através de um processo semelhante. Entretanto, em pesquisas anteriores visando utilizar essa reação na

determinação de HMF e MF, a aplicação foi limitada devido à instabilidade da espécie colorida produzida [84].

Nos experimentos realizados neste trabalho, foi formado um produto amarelo, com absorção máxima em 440 nm. Esse produto se sobrepõe à faixa espectral coberta pelo canal B no sistema RGB e representa a cor complementar do produto de absorção, conforme evidenciado no espectro de absorção ilustrado na Figura 4. Esse produto provavelmente corresponde àquele formado na Eq. 1, ou seja, a segunda etapa da reação não ocorre no caso do HMF. Conforme demonstrado em um estudo anterior, o HMF apresenta uma faixa de absorção espectral de 400–600 nm quando combinado com acetato de anilina, resultando em uma cor laranja [86]. Outro estudo relatou que em concentrações de HMF a $0,5\text{--}2,0\ \mu\text{g mL}^{-1}$, não há observação visual de cor e o pico de absorção ocorre no UV a 354 nm. No entanto, em concentrações mais elevadas ($10\text{--}200\ \mu\text{g mL}^{-1}$), o HMF produz cores de amarelo a laranja, com um máximo de absorção na faixa espectral de 400–600 nm [87]. É importante destacar que o valor do pico de absorção encontrado em nosso trabalho está dentro da faixa relatada pelos estudos citados. Para as medições fotométricas foi escolhido, portanto, o canal B devido à sua maior sensibilidade analítica e uma correlação mais linear entre a concentração de HMF e o canal B, com um coeficiente de correlação de 0,9942.

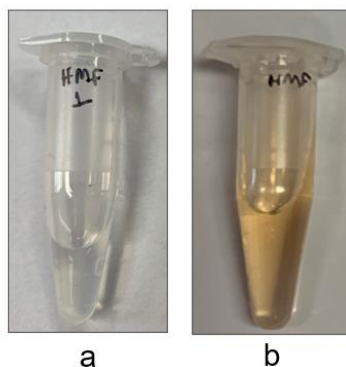
Figura 4 - Sobreposição do espectro de absorção do produto da reação entre anilina e HMF $60\ \text{mg L}^{-1}$ (—) e a curva normalizada hipotética que ilustra a faixa espectral coberta pelo canal B (---) do sistema RGB. A imagem corresponde à fotografia do microtubo de polipropileno contendo o produto da reação.



Experimentos preliminares foram realizados utilizando 580 μL de uma solução de HMF 60 mg L^{-1} e 20 μL de uma solução de anilina 6% (m/v) preparada em ácido acético concentrado. Essas condições foram adaptadas do método analítico para determinar o furfural na cachaça [30], levando em conta o efeito da matriz.

No entanto, nessas condições, não foi possível observar a formação do produto (Figura 5a). Portanto, decidiu-se aumentar a proporção volumétrica de reagente na mistura reacional para favorecer a reação química. Utilizando volumes iguais de amostra e reagentes, observou-se a formação do produto (Figura 5b) e essa proporção volumétrica foi utilizada nos estudos subsequentes.

Figura 5 - Imagem dos microtubos contendo (a) 580 μL de solução de HMF e 20 μL de solução de anilina e (b) 500 μL de solução de HMF e 500 μL de solução de anilina. Condições experimentais: HMF 60 mg L^{-1} , solução de anilina 6% (m/v) preparada em ácido acético concentrado e 30 min de reação.



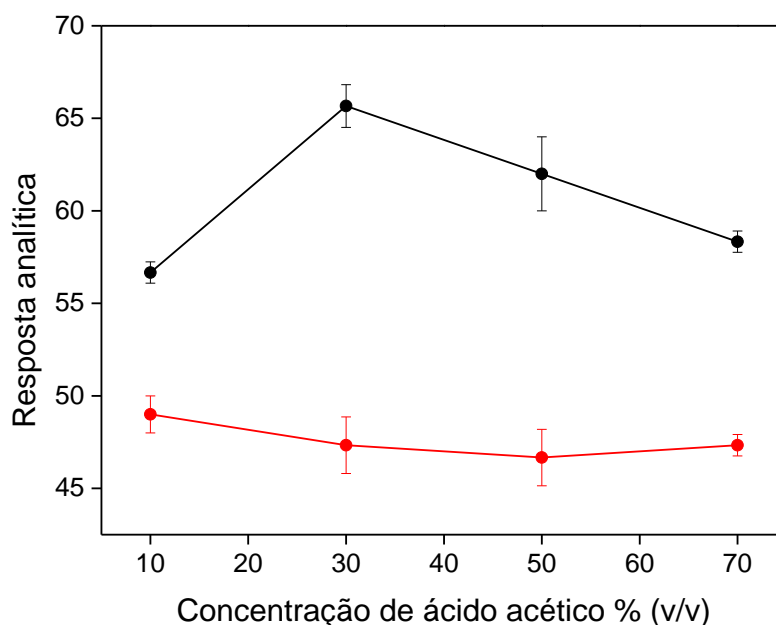
5.1.2. Otimizações

Com o intuito de maximizar a resposta analítica, reduzir o consumo de reagente e solvente e garantir maior precisão dos resultados, o procedimento foi otimizado através do método univariado. O efeito da concentração de ácido acético foi avaliado a fim de obter a melhor resposta analítica e reduzir a quantidade de ácido utilizada. As concentrações de HMF 60 mg L^{-1} e da solução de anilina 6% (m/v) foram mantidas constantes, com volumes de 500 μL de cada solução e as soluções de reagente foram avolumadas com etanol.

A melhor resposta analítica foi obtida com ácido acético 30 % (v/v), com uma diminuição linear no sinal analíticos em concentrações maiores (Figura 6). Estudos anteriores que avaliaram o efeito do ácido acético na reação do HMF com anilina indicaram que a concentração de 40 % (v/v) é satisfatória em termos de sensibilidade e estabilidade de cor [86]. Portanto, a concentração de 30 % (v/v) foi escolhida para os

estudos posteriores, permitindo reduzir a quantidade de ácido acético sem comprometer a sensibilidade e gerando menos resíduos.

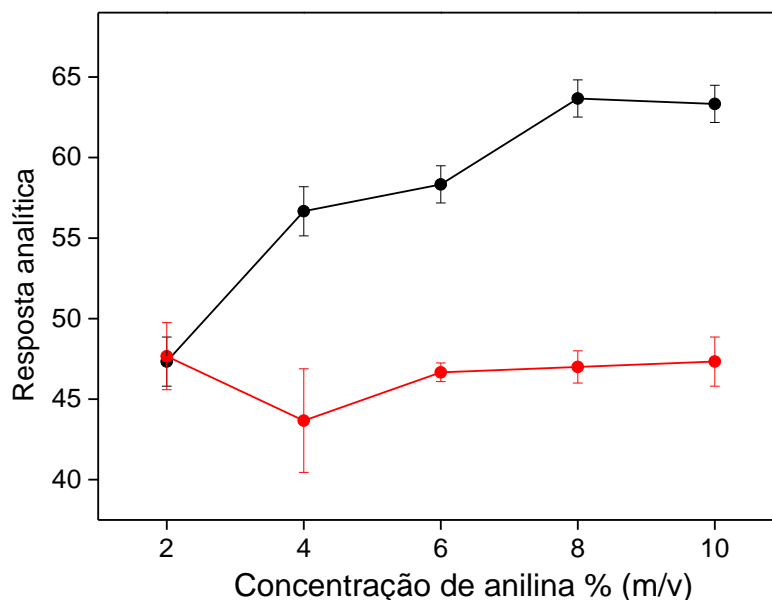
Figura 6 - Efeito da concentração de ácido acético na resposta analítica (●) e sinal de branco (●). Condições experimentais: 500 μL da solução de HMF 60 mg L^{-1} + 500 μL da solução de anilina 6% (m/v) e 30 min de reação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios padrão ($n = 3$).



O método proposto envolve a reação de um aldeído (HMF) com uma amina aromática. Em um estudo que investigou a reação de três furfurais (HMF, MF e 2-F) com várias aminas, verificou-se que a anilina, p-anisidina e p-bromoanilina apresentaram os melhores resultados. No entanto, a anilina mostrou-se mais seletiva na reação com o 2-F e foi a única amina que formou uma base de Schiff em reação com o HMF e o MF [84].

Neste estudo, avaliou-se o efeito da variação da concentração de anilina na reação SR (Figura 7). Os resultados mostraram que houve um aumento significativo na resposta analítica conforme a concentração de anilina aumentou, atingindo um valor máximo em 8% (m/v). Não foram observadas diferenças significativas em concentrações mais elevadas. Um estudo anterior constatou que o aumento da concentração de anilina resulta em uma redução significativa na estabilidade da cor do produto SR [86]. Com base nessas descobertas, optou-se por utilizar uma concentração de anilina de 8% (m/v) como a mais apropriada, pois permite minimizar a quantidade de reagente necessária.

Figura 7 - Efeito da concentração de anilina na resposta analítica (●) e sinal de branco (●). Condições experimentais: 500 μL da solução de HMF 60 mg L^{-1} + 500 μL da solução de anilina em ácido acético 30% (v/v) e 30 min de reação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios padrão ($n = 3$).



O efeito do tempo de reação foi avaliado de 0 a 30 min e observou-se um aumento progressivo na resposta analítica até 10 min, mantendo-se constante após esse período (Figura 8). Acreditava-se que, nessas condições, a reação havia atingido o estado estacionário, porém, após 24 horas, observou-se a formação de um produto de coloração mais intensa, indicando que a reação ainda estava em andamento. Esta observação é concordante com estudos anteriores, em que se avaliou que a reação de anilina com o HMF não havia atingido o equilíbrio após 24h [84].

Essa observação foi confirmada com concentrações de HMF de 60 mg L^{-1} e 200 mg L^{-1} em faixas de tempo maiores, em que se constatou um aumento linear na resposta analítica (Figura 9). Por razões práticas e considerando a proposta de utilizar o método desenvolvido para monitorar o processo de torrefação, o tempo de reação de 10 min foi selecionado para estudos futuros. Isso é viável devido à variação pouco significativa da resposta analítica após 10 min de reação, devido à baixa taxa de formação do produto. Entretanto, devido ao aumento de sensibilidade, o monitoramento após 24 h de reação pode eventualmente ser explorado, por exemplo, para avaliar a qualidade do café torrado. Devido à volatilidade e à instabilidade térmica do HMF, com pontos de fusão e ebulição de 31,5 $^{\circ}\text{C}$ e 115 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente, o aquecimento para acelerar a reação não foi explorado. Essas características tornam

o HMF propenso a evaporar facilmente e suscetível a decomposição ou reações indesejadas em temperaturas elevadas [88].

Figura 8 - Efeito do tempo de reação na resposta analítica (●) e sinal de branco (●). Condições experimentais: 500 μL da solução de HMF 200 mg L^{-1} + 500 μL da solução de anilina 8% (m/v) em ácido acético 30% (v/v). As barras de erro referem-se às estimativas de desvios padrão ($n = 3$).

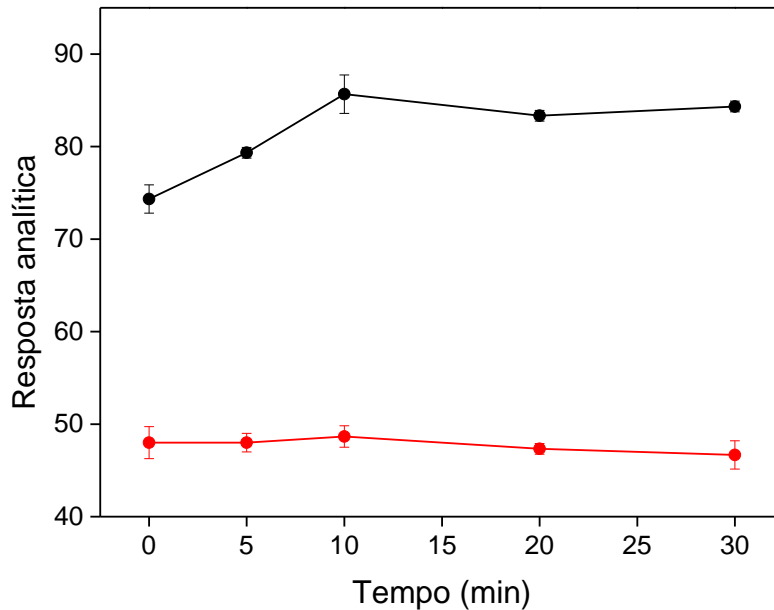
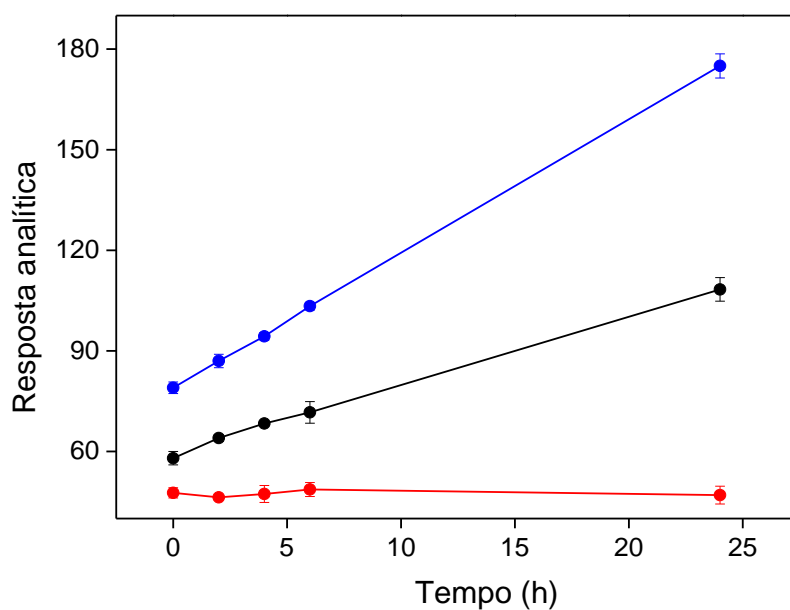


Figura 9 - Efeito do tempo de reação na resposta analítica para HMF 60 mg L^{-1} (●) ou 200 mg L^{-1} (●) e no sinal de branco (●). Condições experimentais: 500 μL da solução de HMF + 500 μL da solução de anilina 8% (m/v) em ácido acético 30% (v/v). As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ($n = 3$).

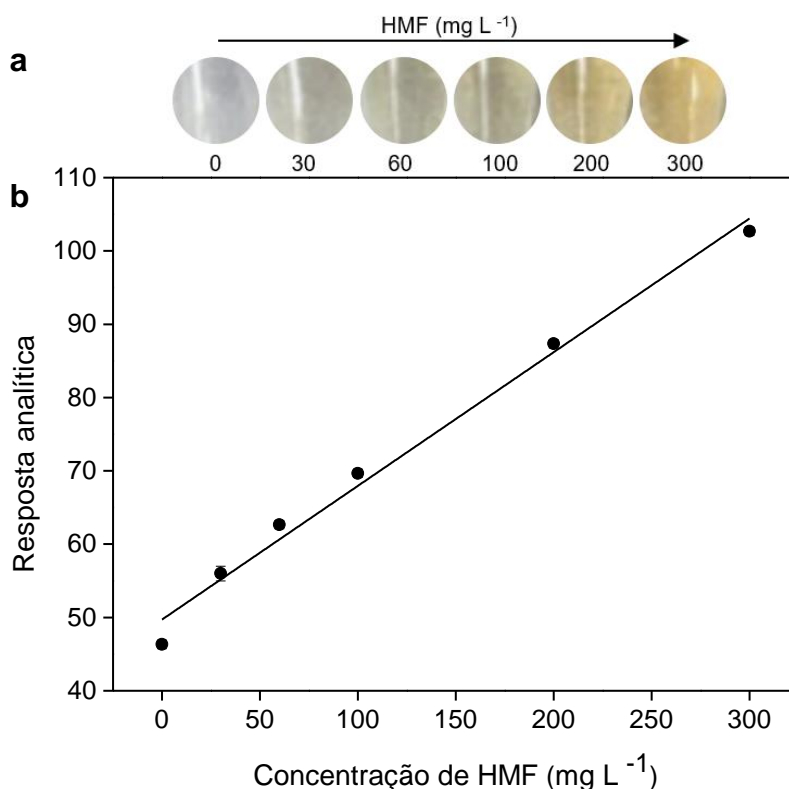


Após as otimizações, o método apresentou um ganho de sensibilidade, com um aumento de ca. 13% no sinal analítico em comparação com a condição inicial.

5.1.3. Características analíticas

Nas condições otimizadas, apresentadas no item anterior, resposta linear foi observada na faixa 30–200 mg L⁻¹, descrita pela equação $S = (50 \pm 2) + (0,18 \pm 0,01) C$ ($r = 0,994$), na qual S se refere ao sinal analítico e C é a concentração de HMF no extrato (mg L⁻¹). Na Figura 10, são apresentadas imagens dos microtubos contendo os produtos gerados nessa faixa de concentração de HMF e a curva de calibração correspondente. Essa faixa de concentração com resposta linear equivale a 0,04–2,60 mg g⁻¹ de café, e está de acordo com o encontrado na literatura, e.g. 2,55 mg g⁻¹ [16]. O coeficiente de variação (CV) foi estimado em 0,92% (n=10). O limite de detecção (LD) foi estimado a partir de diluições sucessivas de uma solução de HMF em etanol, visando determinar a menor concentração de analito que produziu um sinal significativamente diferente do sinal do branco. O valor obtido para o LD foi de 10 mg L⁻¹. O limite de quantificação (LQ) foi então estimado em 33 mg L⁻¹ de HMF (3,3 x LD).

Figura 10 - (a) Imagens dos microtubos contendo o produto da reação colorimétrica entre HMF e anilina; (b) curva analítica de calibração de HMF obtida nas condições otimizadas.



5.1.4. Extração do HMF

Diversos solventes têm sido utilizados na extração de compostos voláteis, tais como etanol, metanol, acetona e misturas aquosas, os quais têm demonstrado eficiência na recuperação desses compostos [89]. Assim, foram avaliados a água e o etanol, solventes em que o HMF é bastante solúvel [90], para a extração, com o objetivo de maximizar a extração do analito e diminuir a coloração do extrato. A extração do HMF foi realizada por infusão de café torrado e moído em água a 90 °C por 2 min [22], com proporções de 1g:10 mL, 1g:50 mL e 1g:100 mL, além de em etanol a frio, na razão 1g:10 mL. Como demonstrado na Figura 11, a extração em etanol resultou em uma significativa redução na intensidade da cor em comparação com a extração em água, utilizando a mesma proporção (1g:10 mL). Entretanto, mesmo com a redução da intensidade de cor do extrato, observou-se intensa sobreposição espectral do produto formado com os extratos de café (Figura 12). Nessa Figura, também se observa um aumento da intensidade da banda de absorção entre 500 e 550 nm, que se refere provavelmente ao produto formado na reação com furfural, como será discutido no item 5.2.

Figura 11 - Imagens dos microtubos contendo extratos de café nas proporções de (a) 1g:10 mL; (b) 1g:50 mL; (c) 1g:100 mL em água e (d) 1g:10 mL em etanol.

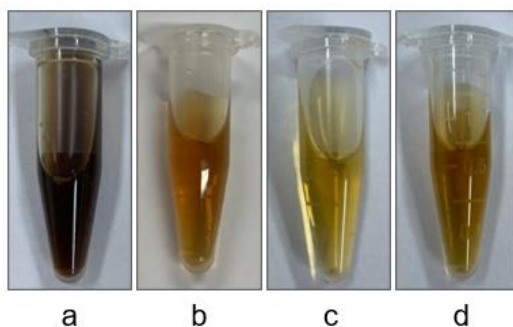
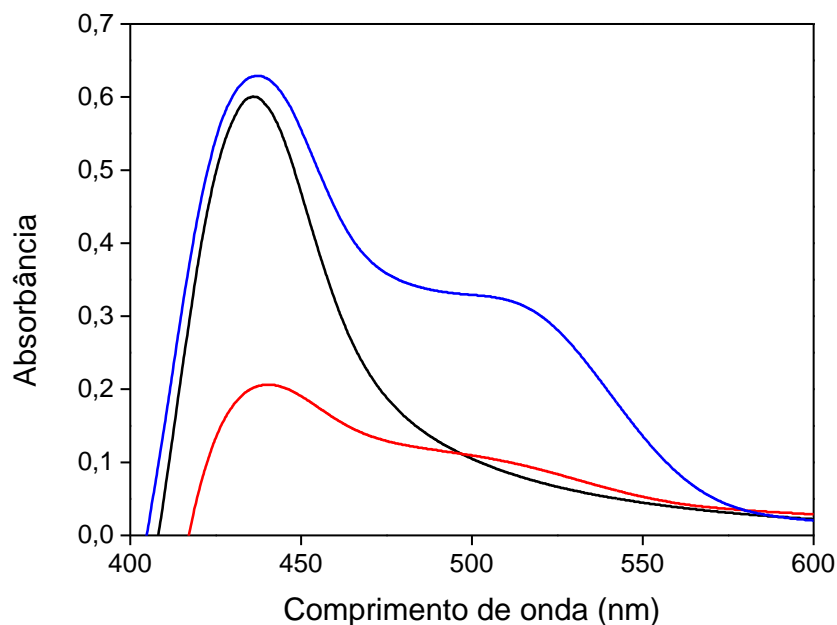


Figura 12 - Espectros de absorção do extrato do café 1:10 (m/v) com (—) e sem (—) adição da anilina 8% (m/v) em ácido acético 30% (v/v); (—) espectro de absorção do produto da reação de anilina com 60 mg L⁻¹ de HMF.



Outros solventes, como acetona, acetonitrila, hexano e metanol, foram avaliados para a preparação dos extratos e diferentes técnicas de extração, como a extração em ponto nuvem (com Triton X-114) e cartuchos de SPE com diferentes grupos funcionais, foram avaliadas para o *clean-up* dos extratos preparados em água. No entanto, tanto os solventes testados quanto as técnicas de extração utilizadas não foram capazes de remover completamente a coloração dos extratos. Como resultado, devido à intensa interferência espectral, não foi possível obter informações quantitativas das amostras de café. Essa limitação impossibilitou a aplicação do método proposto para as amostras de café.

5.2. Determinação de furfural

5.2.1. Aspectos gerais

O método de Hewitt foi também empregado para a detecção do furfural. Esse método consiste na reação do furfural com anilina em meio ácido para formar a furfuralidenanilina, um produto de coloração rosa, conforme descrito na seção 5.1.1.

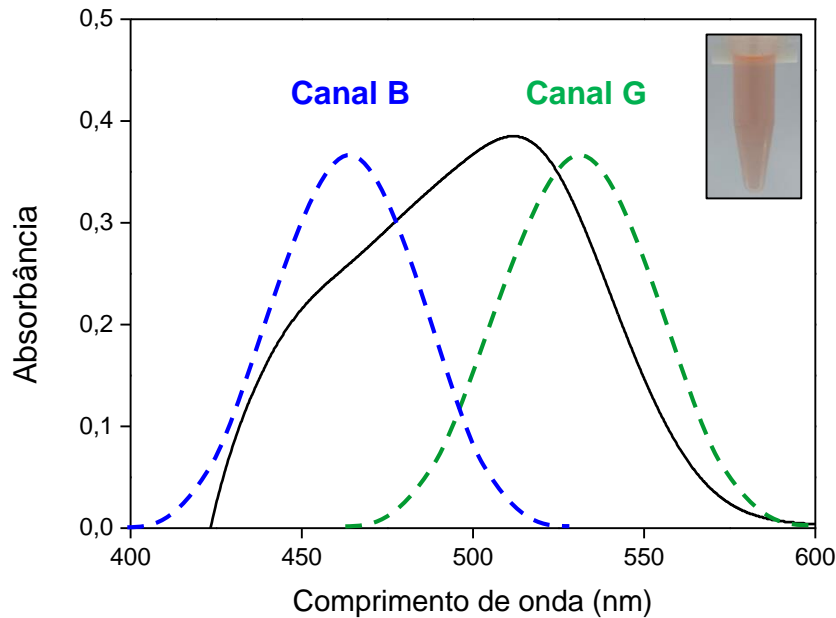
Esse método já foi utilizado para a determinação de furfural em bebidas como cachaça [30] e cerveja [91] e, neste trabalho, foi avaliada a aplicação em amostras de café.

A formação do produto de medida (furfuralidenanilina) depende do grupo aldeído, ou seja, a reação entre furfural (ou derivados) e acetato de anilina não ocorre se o grupo aldeído estiver modificado, por exemplo, por oxidação em ácido piromúxico ou por redução a álcool. Dessa forma, a reação é seletiva para a aldeídos [92]. Estudos anteriores relatam que a absorção máxima do produto ocorre na faixa de 506–518 nm, dependendo da concentração de ácido acético [87], enquanto outros estudos indicam que a região de máxima absorção depende principalmente do tipo de amina reagente, sendo que para a anilina a absorção máxima ocorre em torno de 525 nm [84].

Nos experimentos realizados com furfural, a furfulidenanelina apresentou absorção máxima de radiação em 510 nm, e a banda de absorção sobrepõe-se parcialmente às regiões espectrais coberta pelos canais G e B do sistema RGB (Figura 13), que correspondem às cores complementares do produto. A absorção máxima observada coincide com o que foi relatado em trabalhos anteriores [93], *i.e.* 518 nm. O canal G foi escolhido para as medições fotométricas por corresponder a *ca.* 40% da variação total do sinal, o que deve resultar em maior sensibilidade analítica em comparação com medições no canal B, que corresponde a *ca.* 30% da resposta total. Ademais, foi observada uma correlação mais linear com a concentração de furfural no canal G ($r = 0,998$ *versus* 0,993 no canal B). A combinação vetorial dos canais G e B, de acordo com a Equação 3, não melhorou a sensibilidade significativamente e prejudicou a linearidade ($r = 0,993$).

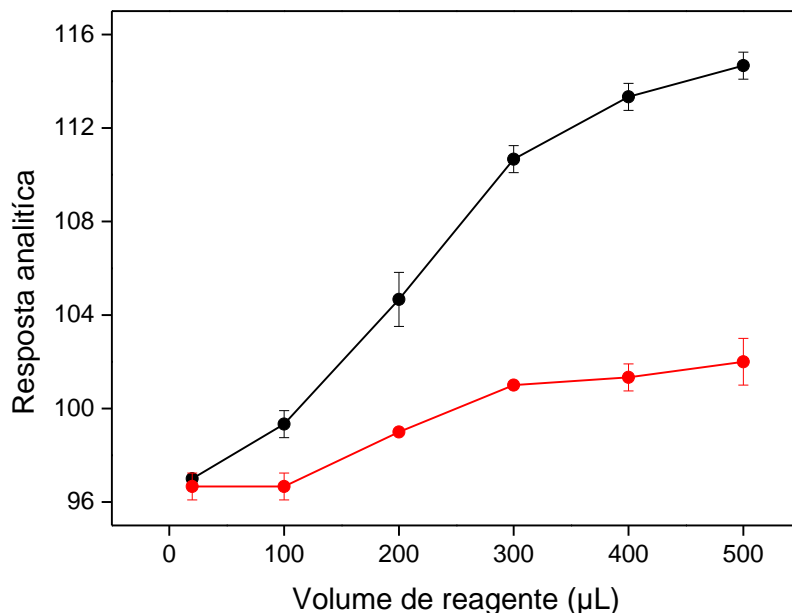
$$S = \sqrt{(255 - G)^2 + (255 - B)^2} \quad (3)$$

Figura 13 - Espectro de absorção da furfulidenanelina formada a partir de uma solução de furfural 20 mg L^{-1} (—) e as curvas normalizadas hipotéticas que ilustram as faixas espectrais cobertas pelos canais B (---) e G (---) do sistema RGB. A imagem inserida refere-se à fotografia do microtubo de polipropileno contendo o produto da reação.



Com o intuito de observar a formação do produto colorimétrico através da reação entre o furfural e a anilina em meio ácido, foram realizados experimentos preliminares. Mantendo um volume fixo de $1000 \mu\text{L}$ de amostra com concentração de furfural de $0,66 \text{ mg L}^{-1}$, variou-se o volume do reagente (solução de anilina 10% (m/v) preparada em ácido acético concentrado). O objetivo foi estabelecer o volume mais adequado para a formação do produto da reação, conforme mostrado na Figura 14. Observou-se que, ao utilizar $20 \mu\text{L}$ do reagente, não ocorreu a formação significativa do produto, não apresentando diferenças significativas em relação ao sinal analítico do branco. No entanto, à medida que o volume do reagente foi aumentado, houve um significativo aumento na resposta analítica, especialmente quando foram utilizados $500 \mu\text{L}$ de reagente. Nessa proporção de 2:1 (v/v) entre amostra e reagente, foi possível obter resultados mais consistentes. Essa proporção foi então fixada para os estudos subsequentes.

Figura 14 - Efeito do volume de reagente na resposta analítica (●) e sinal de branco (●). Condições experimentais: 1000 μL da solução de furfural $0,66 \text{ mg L}^{-1}$ + solução de anilina 10% (m/v) e 5 min de reação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios padrão ($n = 3$).



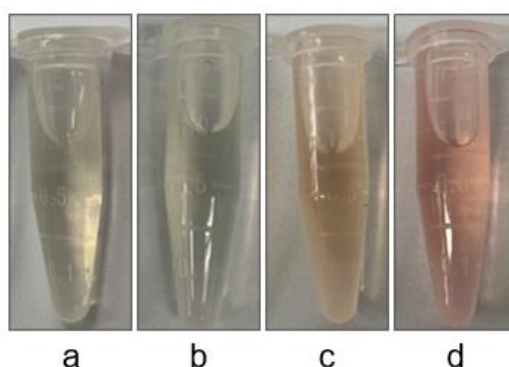
Foram conduzidos experimentos para avaliar o meio mais adequado para a formação do produto de medida. Soluções de anilina 10% (m/v) foram preparadas em água, etanol e em diferentes proporções de água:ácido acético e etanol:ácido acético. Os resultados do estudo qualitativo demonstraram que a formação da furfulidenanelina ocorreu exclusivamente nas soluções contendo ácido acético (Figura 15). Esse resultado era esperado, uma vez que um meio ácido é essencial para a formação do produto, conforme relatado em estudo anterior [94]. No estudo mencionado, realizado para determinar a presença de furfural em amostras de combustível, foram avaliadas soluções de anilina na presença e ausência de ácido acético. Verificou-se que na ausência do ácido, nenhuma mudança de cor foi detectável, enquanto na presença do ácido houve a formação do produto de medida, indicando a presença de furfural.

Os dois solventes utilizados, água e etanol, mostraram a capacidade de formar o produto de medida quando em meio ácido. No entanto, é importante destacar que em meio ácido pode ocorrer a degradação do furfural em outros compostos, como o álcool furfurílico. Em estudos anteriores, foi observado que a adição de álcoois ao meio reacional pode estabilizar intermediários reativos e retardar a degradação do furfural [95]. Essa abordagem foi discutida anteriormente, considerando que a

presença de álcoois no meio pode contribuir para uma melhor preservação e detecção precisa do furfural durante a reação colorimétrica.

Outro aspecto que contribui para a obtenção de resultados mais satisfatórios em meio contendo etanol é a solubilidade da anilina. Enquanto a anilina é levemente solúvel em água, ela é facilmente miscível com a maioria dos solventes orgânicos, especialmente em meio ácido [96].

Figura 15 - Imagens dos microtubos após reação com anilina preparada em diferentes solventes: (a) água; (b) etanol; (c) água:ácido acético e (d) etanol:ácido acético. Condições experimentais: 1000 μL de solução de furfural $0,66 \text{ mg L}^{-1}$ + 500 μL da solução de anilina 10% (m/v) e 5 min de reação.



5.2.2. Otimização

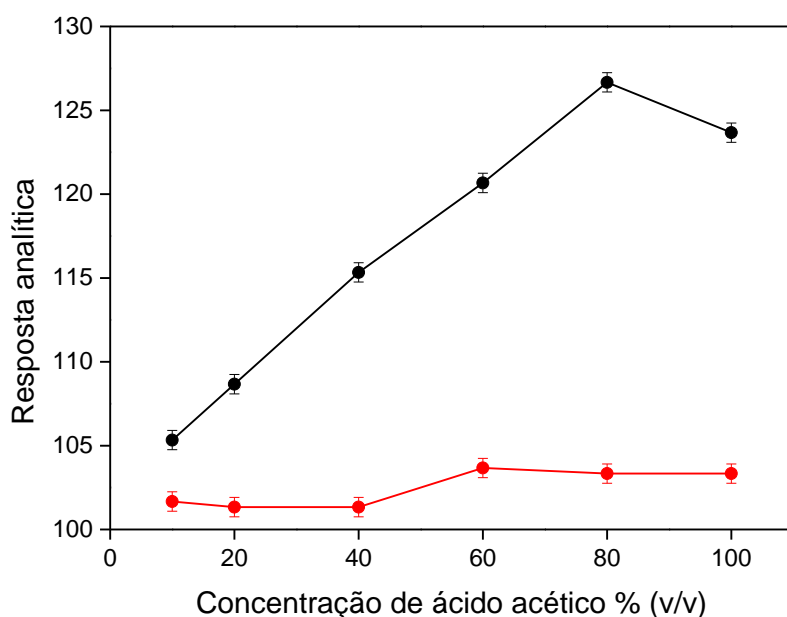
Para melhorar a sensibilidade analítica, a precisão dos resultados e reduzir o consumo de solventes e reagentes, o procedimento foi otimizado através do método univariado. O efeito da concentração de ácido acético foi investigado a fim de maximizar a resposta analítica e minimizar a quantidade de ácido utilizada.

Neste estudo, as concentrações de furfural e anilina foram mantidas constantes em $0,66 \text{ mg/L}$ e 10% (m/v), respectivamente. Os volumes utilizados foram de 500 μL de reagente e 1000 μL da solução de furfural em meio de etanol. Com base nos resultados apresentados na Figura 16, a concentração de ácido acético de 80% (v/v) demonstrou a maior resposta analítica e foi selecionada para estudos futuros. De acordo com Stillings and Browning [86], o aumento da concentração de ácido acético contribui para uma significativa melhoria na estabilidade da cor.

Por outro lado, observou-se que concentrações acima de 80% (v/v) de ácido acético resultaram em uma diminuição no sinal analítico. Isso sugere que concentrações mais elevadas de ácido podem gerar subprodutos indesejáveis, como

fenilhidroxilamina, nitrosobenzeno e azobenzeno [97], os quais podem afetar a seletividade e sensibilidade do método proposto. Estudos anteriores indicaram que uma concentração final de 0,030 mol/L de ácido acético é suficiente para a formação do produto [30].

Figura 16 - Efeito da concentração de ácido acético na resposta analítica (●) e sinal de branco (●). Condições experimentais: 1000 μ L de solução de furfural 0,66 mg L⁻¹ + 500 μ L da solução de anilina 10% (m/v) e 5 min de reação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios padrão (n = 3).



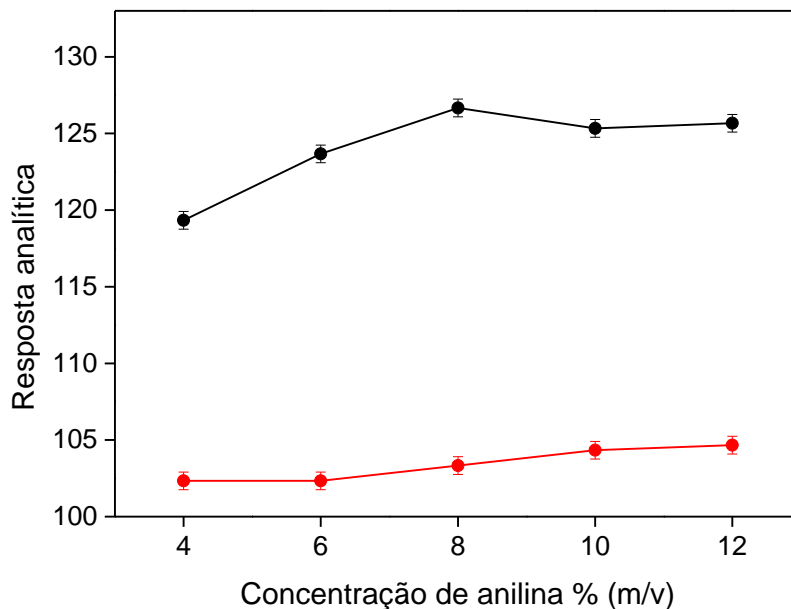
Avaliar o efeito da concentração de anilina na reação é crucial, pois a quantidade de anilina presente na mistura reacional pode afetar a taxa de reação e a quantidade de produto formado. Além disso, é necessário assegurar um excesso de reagente para garantir que a quantidade de furfulidenanelina seja proporcional à quantidade de furfural na amostra [92].

Foi observado que uma concentração de 4% (m/v) de anilina era suficiente para garantir um excesso de reagente. No entanto, para estudos posteriores, optou-se por utilizar uma concentração de 8% (m/v) de anilina devido à melhor resposta analítica (Figura 17). Concentrações mais elevadas foram desconsideradas, uma vez que não apresentaram diferenças significativas.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com as descobertas de Borrow and Jeffreys [98], que também examinaram o efeito da concentração de anilina na reação com o furfural. Descobriu-se que aumentar a concentração de anilina resulta

em maior intensidade de cor e um tempo mais curto para atingir o máximo de absorvância. No entanto, observou-se que, à medida que a concentração de anilina aumenta, a cor começa a se deteriorar mais rapidamente. Isso significa que, apesar de alcançar a intensidade máxima mais rápido, a estabilidade da cor diminui à medida que a concentração de anilina aumenta. Especificamente, eles constataram que concentrações de anilina superiores a 8% v/v resultaram em uma deterioração ainda mais rápida da cor.

Figura 17 - Efeito da concentração de anilina na resposta analítica (●) e sinal de branco (●). Condições experimentais: 1000 μL da solução de furfural 0,66 mg L^{-1} + 500 μL da solução de anilina preparada em ácido acético 80% (v/v) e 5 min de reação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ($n = 3$).



Foi observado que a maior resposta analítica na reação entre o furfural e anilina ocorre entre 5 e 15 min, sem diferença significativa nos sinais analíticos nessa faixa de tempo (variações < 3%), conforme mostrado na Figura 18. Desta forma, foi definido o tempo de reação de 5 min para garantir a maior estabilidade do produto e obter resultados precisos.

Adicionalmente, o efeito do tempo de reação foi avaliado em um extrato de café (Figura 19) e foi verificado o mesmo comportamento, indicando a ausência de efeitos de matriz que afetam a taxa de formação do produto. Esse tempo de reação é compatível com a proposta de monitorar o processo de torrefação e garantir a qualidade do café. Para efeito de comparação, em outro estudo, que visava

determinar furfural em cachaça [30], foi necessário um tempo de 15 min para que a reação atingisse o estado estacionário.

Foi observado em ambas as análises, que à medida que o tempo de reação aumenta, ocorre a diminuição no sinal analítico devido à degradação do produto. A instabilidade do produto SR contribui para essa degradação. Inicialmente, o produto SR apresenta uma cor rosa característica e uma forma linear. No entanto, à medida que o tempo de reação avança, os produtos formados passam por ciclização, resultando em produtos de cadeia cíclica menos estáveis e incolores [94].

Figura 18 - Efeito do tempo de reação na resposta analítica (●) e sinal de branco (●). Condições experimentais: 1000 μL da solução de furfural 0,66 mg L^{-1} + 500 μL da solução de anilina 8% (m/v) em ácido acético 80% (v/v).

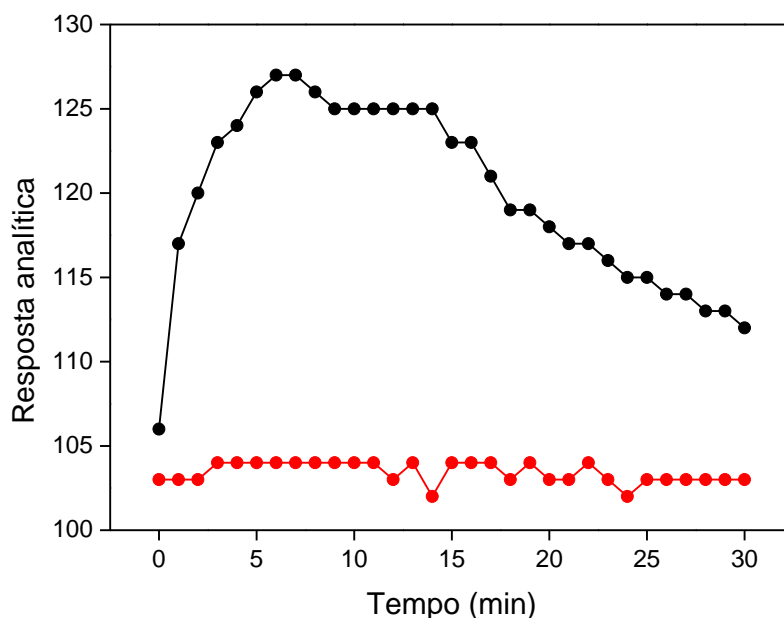
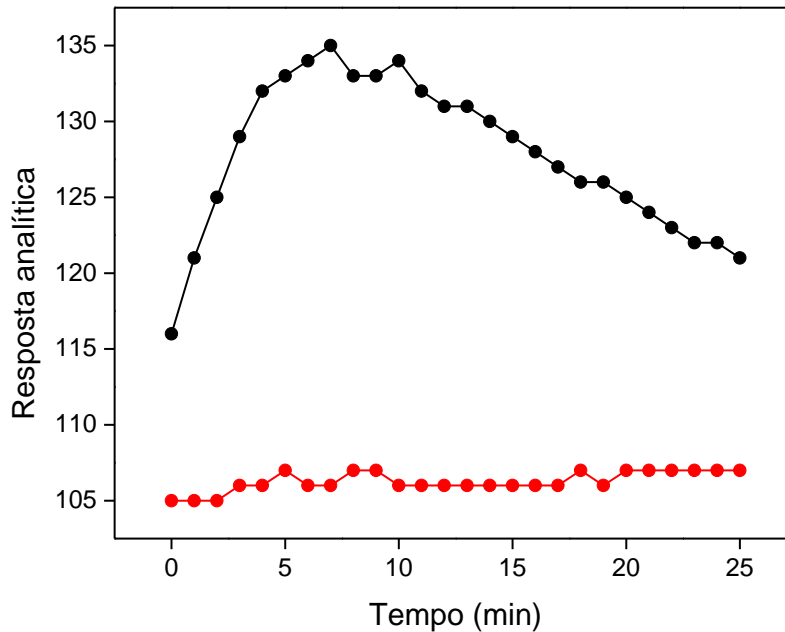


Figura 19 - Efeito do tempo de reação na resposta analítica do extrato de café (●) e sinal de branco (●). Condições experimentais: 1000 μ L do extrato de café + 500 μ L da solução de anilina 8% (m/v) em ácido acético 80% (v/v).



Após as otimizações, houve um ganho significativo de sensibilidade do método, com um aumento de ca. 25% no sinal analítico em comparação com a condição inicial.

5.2.3. Extração do furfural

Com o objetivo de minimizar eventuais interferências na resposta analítica devido à cor do extrato da amostra, foi avaliado o efeito da intensidade da cor do extrato extraído em etanol em diferentes proporções amostra/solvente. Para isso, foram utilizados os métodos de extração descritos na seção 5.1.3.

O etanol foi escolhido como solvente para a extração de furfural devido à sua capacidade de solubilizar o analito nesse meio. O furfural é solúvel na maioria dos solventes orgânicos, com exceção dos hidrocarbonetos alifáticos saturados, e possui baixa solubilidade em água [93]. Além disso, o uso de etanol como solvente ajuda a minimizar a extração de compostos coloridos da amostra, conforme discutido na seção 5.1.4.

A relação massa/volume é um parâmetro que influencia a eficiência da extração (afetando a taxa de transferência do analito) e a concentração do analito e de espécies

concomitantes no extrato [99]. Assim, foram avaliadas diferentes proporções de massa de amostra/volume de solvente: 0,1 g:2,0 mL, 0,1 g:5,0 mL e 0,1 g:10,0 mL.

Os resultados (Tabela 4) indicaram que a maior resposta analítica foi obtida na amostra de café extraída com o menor volume de etanol, ou seja, na proporção de 0,1 g:2 mL. Nessa proporção, a concentração de furfural encontrada foi de $15,02 \pm 0,07$ mg kg⁻¹, enquanto os volumes de 5 mL e 10 mL de etanol resultaram em concentrações de $17,3 \pm 0,1$ e $15,75 \pm 0,08$ mg kg⁻¹, respectivamente. Com base nesses resultados, decidiu-se adotar a proporção de 0,1 g de amostra extraída em 2 mL de etanol para todas as análises subsequentes. Essa escolha garantirá a máxima detectabilidade analítica, com menor volume de solvente para uma dada massa de amostra.

Tabela 4 - Avaliação do efeito da proporção massa de amostra/volume solvente. Condições de extração: 0,1 g de café moído + etanol anidro. Condições experimentais: 1000 µL do extrato de café + 500 µL da solução de anilina 8% (m/v) em ácido acético 80% (v/v) e 5 min de reação.

Volume de etanol (mL)	Sinal (255 - G)*	Concentração de furfural (mg kg ⁻¹)*
2,0	126,7±0,6	15,02±0,07
5,0	116,7±0,6	17,3±0,1
10,0	108,7±0,6	15,75±0,08

*Média ± desvio padrão (n = 3)

Com o objetivo de aprimorar o processo de extração e aumentar a sensibilidade do método, foram avaliadas diferentes técnicas de extração, incluindo métodos convencionais como extração por imersão e agitação, além da extração assistida por ultrassom (UAE). Foi observada uma diferença significativa entre as técnicas de extração (Tabela 5), com um nível de confiança de 95%. Na mesma amostra de café, a extração por ultrassom resultou em uma concentração de furfural de $20,5 \pm 0,4$ mg kg⁻¹, enquanto as técnicas convencionais, infusão e agitação, apresentaram concentrações entre $14,1 \pm 0,7$ e $16,84 \pm 0,01$ mg kg⁻¹. Os resultados indicam que a extração por ultrassom foi mais eficiente, proporcionando um aumento de aproximadamente 45,4% e 21,7% na extração de furfural em comparação com os métodos convencionais de infusão e agitação, respectivamente.

Tabela 5 - Avaliação de diferentes métodos de extração de furfural. Condições de extração: 0,1 g de café moído + 2 mL de etanol por 5 min de extração. Condições experimentais: 1000 µL do extrato de café + 500 µL da solução de anilina 8% (m/v) em ácido acético 80% (v/v) e 5 min de reação.

Método de extração	Sinal (255 - G)*	Concentração de furfural (mg kg ⁻¹)*
Imersão	125,0±0,8	14,1±0,7
Agitação (vórtex)	129,0±0,9	16,84±0,01
Ultrassom	134,0±0,6	20,5±0,4

*Média ± desvio padrão (n = 3)

A UAE tem recebido destaque devido às altas taxas de extração em tempos reduzidos [89]. Por exemplo, estudos têm sido conduzidos para investigar a aplicação do ultrassom na extração de compostos bioativos em amostras de café. Em um estudo comparativo entre os métodos convencional e ultrassônico, para a extração de cafeína da polpa de café, foi observada uma concentração de cafeína de 49,9±1,3 mg L⁻¹ utilizando o método convencional, enquanto o ultrassom alcançou uma concentração de 206,6±0,1 mg L⁻¹ [100].

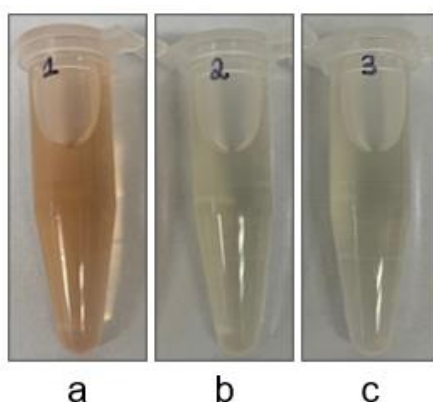
Outro estudo comparou a UAE e o processo de extração convencional, utilizando etanol como solvente, para a extração de polifenóis da borra de café. Foi observada uma recuperação de mais de 83% dos polifenóis disponíveis no extrato utilizando UAE, enquanto a extração convencional alcançou uma recuperação de aproximadamente 64%. Esses resultados indicam uma melhoria de cerca de 33% na recuperação de polifenóis com o uso de ultrassom [99].

Considerando os resultados obtidos e as vantagens oferecidas pela UAE, essa técnica foi selecionada para a extração de furfural do café. Foi realizada uma avaliação do tempo de extração por ultrassom, com intervalos de 5, 10 e 15 min, porém, não foram observadas diferenças significativas, com uma variação < 5%. Portanto, decidiu-se manter o tempo de extração em 5 min.

Com o objetivo de avaliar a eficiência da extração de furfural em amostras de café, foi realizada uma comparação da quantidade de furfural extraído em três etapas distintas. O experimento envolveu a realização de três extrações sucessivas na mesma amostra de café, sendo que a primeira extração extraiu uma concentração de 20,7±0,1 mg L⁻¹, correspondendo a ca. 90% do furfural presente na amostra. Já na segunda e terceira extração, foram extraídos 1,32±0,01 mg L⁻¹ e 0,91±0,01 mg L⁻¹ de furfural, respectivamente, totalizando menos de 10% do furfural extraído. Com base

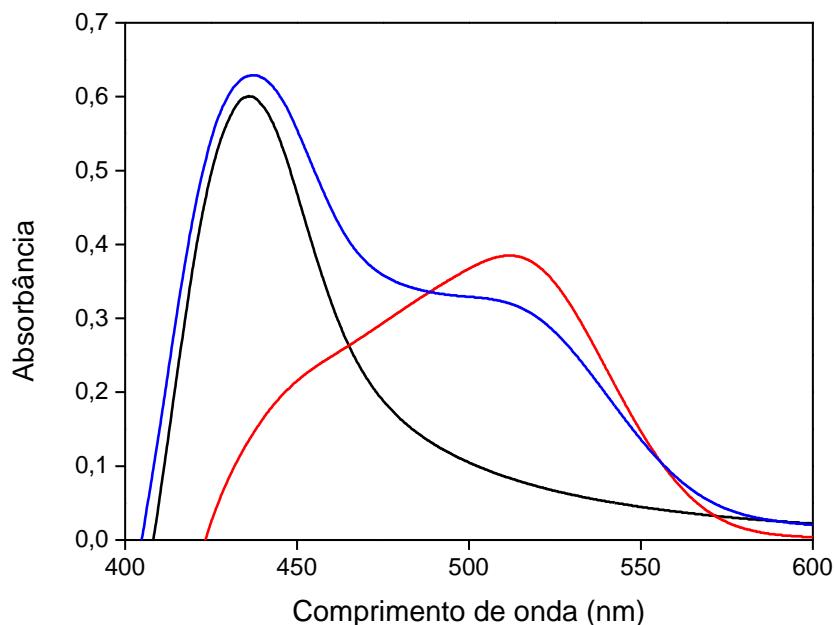
nos resultados obtidos, concluiu-se que uma única etapa de extração é suficiente para extrair o furfural da amostra de café. Essa abordagem economiza tempo na preparação dos extratos e reduz possíveis erros sistemáticos. A Figura 20 apresenta a intensidade de cor observada em cada etapa da extração após a derivação química, oferecendo uma visualização clara do processo e confirmando a eficácia da extração única para obter os resultados desejados.

Figura 20 - Imagens dos extratos de café obtidos por extrações UAE sequenciais, após derivação química com anilina: (a) 1ª etapa; (b) 2ª etapa e (b) 3ª etapa de extração. Condições experimentais: 1000 μ L do extrato de café + 500 μ L da solução de anilina 8% (m/v) em ácido acético 80% (v/v) e 5 min de reação.



Ao avaliar os espectros resultantes da extração com etanol, foi observado que o extrato da amostra de café apresenta máxima absorção em 440 nm, enquanto o produto da reação com anilina apresenta absorção máxima em 510 nm (Figura 21). Essa diferença minimiza a sobreposição espectral e viabiliza a determinação de furfural nos extratos etanólicos de café. Entretanto, espera-se que haja alguma absorção de radiação pela coloração dos extratos no comprimento de onda de medida, como será discutido posteriormente.

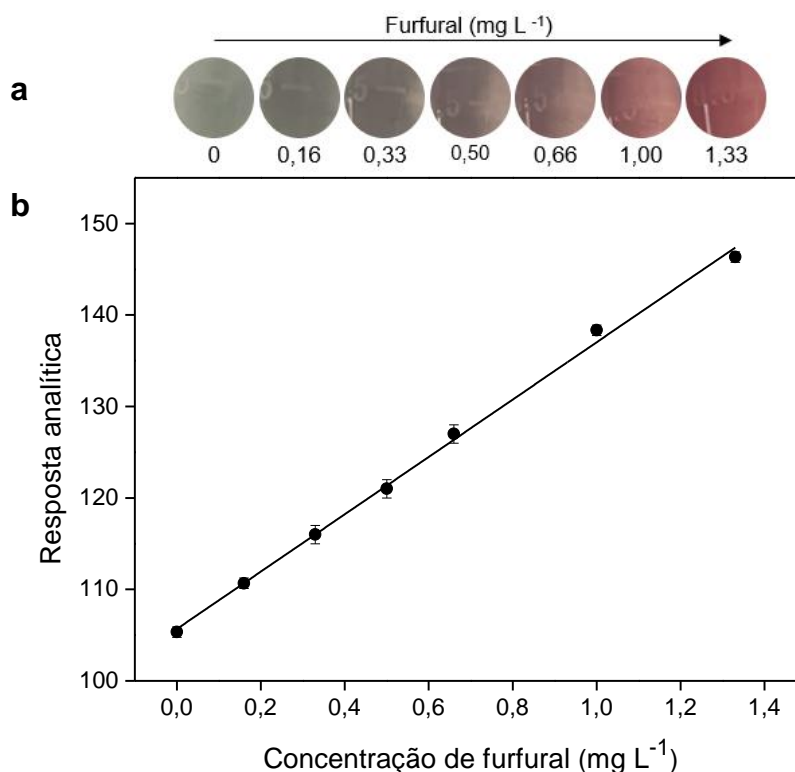
Figura 21 - Espectros de absorção UV-vis do extrato do café, preparado em etanol na proporção 1g:2 mL com (—) e sem (—) adição do reagente cromogênico; (—) espectro de absorção UV-vis da solução de 20 mg L⁻¹ de furfural adicionada de reagente cromogênico.



5.2.4. Características analíticas

Nas condições otimizadas, resposta linear foi observada na faixa 0,16–1,33 mg L⁻¹ furfural, descrita pela equação $S = (104,4 \pm 0,5) + (29,2 \pm 0,7) C$ ($r = 0,998$), na qual S se refere ao sinal analítico (255 - G) e C é a concentração de furfural no extrato (mg L⁻¹). Na Figura 22, são apresentadas imagens dos microtubos de polipropileno contendo os produtos gerados nessa faixa de concentração de furfural e a curva de calibração correspondente. A faixa de concentração com resposta linear equivale a 0,2–1,7 mg g⁻¹ café. O coeficiente de variação (CV) foi estimado em 0,54% (0,5 mg L⁻¹ furfural, n=10). O LD foi estimado a partir de diluições sucessivas de uma solução de furfural em etanol, visando determinar a menor concentração de analito que produziu um sinal analítico significativamente diferente do sinal do branco com 95% de confiança. O valor obtido para o LD foi de 0,05 mg L⁻¹. O LQ foi então estimado em 0,165 mg L⁻¹ de furfural (3,3 x LD).

Figura 22 - (a) Imagens dos microtubos de propileno contendo o produto da reação colorimétrica e (b) curva analítica de calibração obtida nas condições otimizadas para determinação de furfural, usando os resultados do canal G do sistema RGB (n = 3).



A linearidade se refere à capacidade do método de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa analítica específica [101]. Para avaliar esse parâmetro, os dados do canal G foram analisados por meio de dois métodos distintos, ambos fundamentados na estimativa de reflectância. O primeiro método envolveu a determinação do sinal analítico (S) por meio da expressão ($S = 255 - G$), em que 255 é o valor correspondente à reflexão total de radiação e G é o valor médio do canal G obtido para cada amostra ou solução de referência [77]. O segundo método envolveu o cálculo do logaritmo (Equação 4), onde G_0 é o valor médio do canal G referente ao branco [102]. Ambos os tratamentos têm sido utilizados em fotometria por imagens digitais [32,69,80,81].

$$S = \log\left(\frac{G_0}{G}\right) \quad (4)$$

Observando os coeficientes de correlação linear (Tabela 6), conclui-se que não houve diferença significativa entre os dois tratamentos. Os tratamentos de dados

foram validados através do ajuste satisfatório aos dados experimentais, utilizando o teste *lack-of-fit* [103]. Os valores obtidos para a estatística de teste (F_{CALC}) foram de 2,1 para o tratamento 255-G e de 1,7 para o tratamento logarítmico, ambos inferiores aos valores tabelados (F_{TAB}), 3,7 e 3,3 (95% de confiança), respectivamente, indicando que o modelo linear é adequado para a correlação dos dados em ambos os tratamentos.

Tabela 6 - Dados de linearidade da curva de calibração pelos diferentes tratamentos de dados (95% de confiança).

Tratamento de dados	Correlação linear (r)	F_{CALC}	F_{TAB}
255 - G	0,9985	2,1	3,7
log (G ₀ /G)	0,9984	1,7	3,3

Para avaliar a recuperação do furfural, amostras de café foram dopadas com concentrações conhecidas de 0,66 e 1,33 mg L⁻¹ do analito. Após a extração, o furfural foi quantificado e a porcentagem de recuperação foi determinada pela Equação 5:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(\text{concentração determinada} - \text{concentração adicionada})}{\text{concentração adicionada}} \times 100 \quad (5)$$

Ao analisar a Tabela 7, observa-se que as recuperações do analito apresentaram variações de 90–112%, com uma média de 100%, quando avaliadas pelo tratamento 255-G. Já as recuperações avaliadas através do logaritmo variaram de 87–104%, com média de 99%. Ambas as recuperações são aceitáveis e a diferença entre os dois tratamentos de dados não foi significativa. Além disso, as recuperações indicam a ausência de efeitos da matriz e demonstram a viabilidade de utilizar a calibração externa (soluções de referência de furfural preparadas em etanol) para a quantificação do analito. A título de comparação, os valores de recuperação de furfural são consistentes com os obtidos em um estudo realizado com cafés torrados e determinação por HPLC (recuperações entre 87% e 103%) [22].

Tabela 7 - Recuperações de furfural adicionado a amostras de café.

Amostra de café	Concentração adicionada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)*	
		255 - G	Log (G ₀ /G)
1	0,66	93 ± 5	87 ± 4
	1,33	98 ± 1	100 ± 1
2	0,66	105 ± 3	100 ± 2
	1,33	101 ± 1	104 ± 1
3	0,66	105 ± 3	100 ± 3
	1,33	99 ± 1	102 ± 1
4	0,66	112 ± 6	106 ± 5
	1,33	100 ± 2	101,9 ± 0,4
5	0,66	103 ± 5	100 ± 5
	1,33	90 ± 2	92,7 ± 0,4
6	0,66	103 ± 5	98 ± 4
	1,33	91 ± 3	92 ± 3

*Média ± desvio padrão (n = 3)

A exatidão é um parâmetro fundamental na validação de um método analítico, pois está relacionada à concordância entre o valor de concentração real na amostra e o valor estimado pelo processo analítico [101]. Com o objetivo de avaliar a exatidão, amostras de cafés foram analisadas utilizando o procedimento proposto, e os resultados foram comparados com os obtidos pelo procedimento de referência [23], baseado em HPLC, utilizando os erros relativos como medida de comparação, conforme apresentado na Tabela 8. Foram observados valores elevados de erro relativo, o que indica uma grande discrepância entre os valores medidos/estimados e os valores de referência.

Foi observado que os extratos das amostras, embora apresentem máximo de absorção em torno de 440 nm (coloração amarela), também apresentam absorção na faixa de comprimentos de onda correspondente à absorção pelo produto da reação, em torno de 510 nm (Figura 21). Essa sobreposição espectral indica que a absorção pelo extrato da amostra no canal de medida não pode ser desprezada. Para evitar a interferência espectral, foi proposta a estratégia de realizar uma correção matemática nos sinais gerados. Para isso, foi subtraído o valor de absorção correspondente ao extrato da amostra no canal G (valores médios de G_{branco} entre 1,3 e 7,7). Após a correção dos dados utilizando o branco da amostra no método proposto, foi observada melhora significativa nos erros relativos (Tabela 9). Essa redução indica uma melhoria

na exatidão do método, uma vez que os valores medidos estão mais próximos dos valores de referência.

Tabela 8 - Teores de furfural em amostras de cafés especiais torrados determinados pelo procedimento proposto e de referência.

Amostra de café	Teor de furfural (mg kg ⁻¹)*		Erro relativo (%)
	Proposto	Referência [22]	
1	16,7 ± 0,4	11,3 ± 0,2	+48,2
2	17,3 ± 0,4	13,8 ± 1,1	+25,6
3	18,9 ± 0,4	14,4 ± 0,9	+31,1
4	17,9 ± 0,4	12,06 ± 0,03	+48,6
5	15,9 ± 0,4	10,7 ± 0,3	+48,4
6	17,1 ± 0,4	12,0 ± 0,1	+43,8
7	20,3 ± 0,4	25,8 ± 0,8	-21,1
8	17,1 ± 0,4	12,3 ± 1,7	+39,6
9	21,2 ± 0,6	16,9 ± 0,5	+25,0
10	19,7 ± 0,4	15,3 ± 0,6	+27,9
11	19,7 ± 0,4	16,1 ± 0,8	+22,5
12	20,6 ± 0,6	18,5 ± 1,7	+11,1

*Média ± desvio padrão (n = 3)

Tabela 9 - Teores de furfural das amostras de cafés especiais torrados determinados pelo procedimento proposto e de referência, após a correção pela absorção da amostra.

Amostra de café	Teor de furfural (mg kg ⁻¹)*		Erro relativo (%)
	Proposto	Referência [22]	
1	11,0 ± 0,4	11,3 ± 0,2	-2,2
2	11,6 ± 0,4	13,2 ± 0,2	-11,5
3	12,4 ± 0,4	14,4 ± 0,9	-13,8
4	13,5 ± 0,4	12,06 ± 0,02	+11,6
5	11,2 ± 0,4	10,7 ± 0,3	+4,8
6	12,0 ± 0,4	12,0 ± 0,12	+0,06
7	15,9 ± 0,4	25,8 ± 0,8	-38,4
8	14,5 ± 0,4	11,30 ± 0,01	+28,1
9	16,7 ± 0,6	16,9 ± 0,5	-1,4
10	13,9 ± 0,4	15,3 ± 0,6	-9,2
11	14,7 ± 0,4	15,6 ± 0,2	-6,2
12	15,9 ± 0,6	17,5 ± 0,1	-9,2

*Média ± desvio padrão (n = 3)

No estudo conduzido por Stillings and Browning [86], foram investigadas as condições necessárias para a determinação do furfural pelo método colorimétrico utilizando a reação entre furfural e acetato de anilina. Foi observado que o HMF e o MF não introduziram um erro significativo na determinação fotométrica do furfural quando o acetato de anilina foi utilizado como reagente. O erro associado a essas substâncias foi inferior a 1%. Portanto, pode-se concluir que o HMF e o MF não afetam de forma significativa a estimativa do furfural pelo método do acetato de anilina. Além disso, a reação é seletiva para o furfural e não é afetada por interferências de outros aldeídos, mesmo que esses compostos apresentem semelhanças em seu processo de formação. A sobreposição espectral causada pelos produtos de reação desses aldeídos tem pouca relevância para a determinação do furfural [92-93].

O método proposto para a determinação de furfural em amostras de café é vantajoso por sua praticidade, rapidez e baixo custo. Cada determinação requer apenas 50 mg de amostra, 1 mL de etanol e 40 mg de anilina, gerando somente 1,5 mL de resíduo. A medida fotométrica é realizada por meio de uma câmera de *smartphone* e um aplicativo de conversão de dados, o que torna o método bastante conveniente para análises *in situ*, diretamente nas torrefadoras de café, bem como em laboratórios de rotina.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foram desenvolvidos dois métodos para a análise de furfurais em café torrado. O primeiro método foi desenvolvido para a determinação de furfural, enquanto o segundo método foi desenvolvido para a determinação de HMF. Ambos os métodos utilizam a reação que envolve o furfural e a anilina em meio ácido.

O método desenvolvido para a determinação do furfural demonstrou ser eficiente e econômico, proporcionando uma redução significativa no consumo de amostras e reagentes, contribuindo para os preceitos da química verde. A utilização da câmera de um *smartphone* para a medida fotométrica, juntamente com o procedimento *spot test*, torna o método altamente atrativo para o monitoramento *in situ* em torrefadoras. Isso se deve às suas características favoráveis, como a simplicidade dos materiais necessários, incluindo apenas micropipetas, microtubos de polipropileno e um telefone celular. Além disso, o método desenvolvido para a determinação de furfural demonstrou resultados consistentes com o método de referência, exibindo características analíticas adequadas, tais como linearidade, limite de detecção e exatidão. Esses resultados indicam que o método é uma alternativa confiável para a determinação de furfural em cafés torrados, em conformidade com as normas vigentes. Essa abordagem metodológica permite a determinação precisa do teor de furfural em café torrado, o qual desempenha um papel importante como indicador de qualidade e grau de torra do café.

Por outro lado, mesmo com os esforços realizados para determinar o composto HMF em extratos de café, utilizando diferentes solventes, métodos de extração e técnicas de purificação, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Isso se deve principalmente à intensa sobreposição espectral entre o extrato da amostra e o espectro de absorção máximo do HMF, o que dificulta a detecção e quantificação precisa desse composto. A sobreposição resultante gera interferências espectrais significativas, tornando desafiador distinguir as características espectrais do HMF das demais espécies presentes na amostra. Como resultado, não foi possível desenvolver um método eficaz para a determinação de HMF em cafés torrados.

REFERÊNCIAS

- [1] ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J.M.; PIZARRO, C. An evaluation of orthogonal signal correction methods for the characterisation of arabica and robusta coffee varieties by NIRS. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, p. 57–67, 2004.
- [2] BARBOSA, I.P.; OLIVEIRA, A.C.B.; ROSADO, R.D.S.; SAKIYAMA, N.S.; CRUZ, C.D.; PEREIRA, A.A. Sensory quality of *Coffea arabica* L. genotypes influenced by postharvest processing. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 428–435, 2019.
- [3] CECAFÉ – CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. **Relatório mensal de exportações dezembro 2022**, São Paulo, SP, 2023. Disponível em: <<http://www.cecafe.com.br/publicacoes/relatorio-de-exportacoes/>>. Acesso em: 20 de jan. de 2023.
- [4] BADMOS, S.; FU, M.; GRANATO, D.; KUHNERT. Classification of Brazilian roasted coffees from different geographical origins and farming practices based on chlorogenic acid profiles. **Food Research International**, v. 134, 109218, 2020.
- [5] DE PAULA, N.C.C.; SILVA, F.C. Café (*Coffea* L): matéria-prima, processamento e qualidade. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 10, n. 4, p. 144–165, 2019.
- [6] LOPES, L.M.V. **Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- [7] BICHO, N.C.; LEITÃO, A.E.; RAMALHO, J.C.; ALVARENGA, N.B.; LINDON, F.C. Identification of nutritional descriptors of roasting intensity in beverages of Arabica and Robusta coffee beans. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 865–871, 2011.
- [8] BELITZ, H.B.; GROCSH W. **Food chemistry**. Zaragoza, Espanha: Editorial Acribia S.A., p. 264–288, p. 938–950, 1988.
- [9] SOMPORN, C.; KAMTUO, A.; THEERAKULPISUT, P.; SIRIAMORNUN, S. Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of arabica coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 2287–2296, 2011.
- [10] FINOT, P.A. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 1–8, 2005.
- [11] FRANCISQUINI, J.A.; MARTINS, E.; SILVA, P.H.F.; SCHUCK, P.; PERRONE, I.T.; CARVALHO, A.F. Maillard Reaction: review. **Journal of Candido Tostes Dairy Institute**, v. 72, n. 1, p. 48–57, 2017.

- [12] DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 209–217, 1999.
- [13] MURKOVIC, M.; BORNIK, M.A. Formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) and 5-hydroxymethyl-2-furoic acid during roasting of coffee. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 4, p. 390, 2007.
- [14] MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Role of roasting conditions in the profile of volatile flavor chemicals formed from coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5823–5831, 2009.
- [15] DIAS, E.C.; PEREIRA, R.G.F.A.; BORÉM, F.M.; CUNHA, S.; FERNANDES, J.O. Determinação dos níveis de trigonelina, furfural, ácidos clorogênicos e cafeína no processamento e na torração dos grãos do café imaturo. In: VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Araxá, MG, 2011. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio7/300.pdf>. Acesso em: 22 de jan. de 2023.
- [16] ALBOUCHI, A.; MURKOVIC, M. LC method for the direct and simultaneous determination of four major furan derivatives in coffee grounds and brews. **Journal of Separation Science**, v.42, p. 1695–1701, 2019.
- [17] CÓRDOBA, N.; MORENO, F.L.; OSORIO, C.; VELÁSQUEZ, S.; ALDUENDA, M.F.; RUIZ-PARDO, Y. Specialty and regular coffee bean quality for cold and hot brewing: Evaluation of sensory profile and physicochemical characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 145, 111363, 2021.
- [18] PETISCA, C.; PÉREZ-PALACIOS, T.; FARAH, A.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Furans and other volatile compounds in ground roasted and espresso coffee using headspace solid-phase microextraction: effect of roasting speed. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 233–241, 2013.
- [19] CHAICHIA, M.; MOHAMMADI, V.G.; HASHEMIB, M.; MOHAMMADI, A. Furanic compounds and furfural in different coffee products by headspace liquid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry: survey and effect of brewing procedures. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 8, n. 1, p. 73–80, 2015.
- [20] QUARTA, B.; ANESE, M. Furfurals removal from roasted coffee powder by vacuum treatment. **Food Chemistry**, v. 130, p. 610–614, 2012.
- [21] MACHEINER, L.; SCHMIDT, A.; KARPFF, F.; MAYER, H.K. A novel UHPLC method for determining the degree of coffee roasting by analysis of furans. **Food Chemistry**, v. 341, 128165, 2021.

- [22] CHAMBEL, P.; OLIVEIRA, M.B.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.A. Development of an HPLC/Diode-Array Detector Method for Simultaneous Determination of 5-HMF, Furfural, 5-O-Caffeoylquinic Acid and Caffeine in Coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 20, n. 18, p. 2949–2957, 1997.
- [23] FEIGL, F.; ANGER, V. **Spot tests in organic analysis**. 7 ed. Amsterdam, Holanda: Elsevier, p. 1–40, p. 444, 1966.
- [24] SOARES, S.; LIMA, M.J.A.; ROCHA, F.R.P. A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 195–199, 2017.
- [25] ZIMMER, A.M.; SPIES, S.M. The paper spot test: a rapid method for quantitating stannous concentrations in radiopharmaceutical kits. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 22, p. 465–467, 1981.
- [26] CHEN, K.C.S.; CHEN, L.; CHEN, L.; LIN, J.Y. Fluorescent spot test method for specific detection of β -lactames. **Analytical Biochemistry**, v. 219, p.53–60, 1994.
- [27] PESSOA, K.D.; SUAREZ, W.T.; REIS, M.F.; FRANCO, M.O.K.; MOREIRA, R.P.L.; SANTOS, V.B. A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 310–316, 2017.
- [28] COLZANIA, H.R.; QUETHELEN, E.A.G.; FOGAÇA, C.; GELINSKI, J.M.L. N.; PEREIRA-FILHO, E.R.; BORGESA, E.M. Determinação de fosfato em refrigerantes utilizando um scanner de mesa e análise automatizada de dados: um exemplo didático para ensino de química. *Química Nova*, v. 40, n. 7, p. 833–839, 2017.
- [29] YANG, X.; PIETY, N.Z.; VIGNES, S.M.; BENTON, M.S.; KANTER, J.; SHEVKOPLYAS, S.S. Simple paper-based test for measuring blood hemoglobin concentration in resource-limited settings. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 1506–1513, 2013.
- [30] FRANCO, M.O.K.; SUAREZ, W.T.; SANTOS, V.B. Digital image method smartphone based for furfural determination in sugarcane spirits. **Food Analytical Methods**, v.10, p. 508–515, 2017.
- [31] BYRNE, L.; BARKER, J.; PENNARUN-THOMAS, G.; DIAMANTE, D.; EDWARDS, S. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 517–522, 2000.
- [32] ACEVEDO, M.S.M.S.F.; LIMA, M.J.A.; NASCIMENTO, C.F.; ROCHA, F.R.P. A green and cost-effective procedure for determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 259–263, 2018.

[33] MCCRACKEN, K.E.; YOON, J.Y. Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: a brief review. **Analytical Methods**, v. 8, p. 6591–6601, 2016.

[34] ORMOND, J.G.P.; DE PAULA, S.R.L.; FAVERET FILHO, P. Café: (Re)Conquista dos Mercados. **BNDES Setorial**, n. 10, p. 3–56, 1999.

[35] MATIELLO, J.B.; CARVALHO, F. Contribuição das ciências agrárias para o desenvolvimento: o caso do café. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 18, v. 3, p. 495–505, 1980.

[36] FARIA, A.C.S.; MANOLESCU, F.M.K. A produção de café no Brasil. In: VIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino-Americano de Pós-Graduação. São José dos Campos, SP, 2004. Disponível em: <https://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2004/trabalhos/inic/pdf/IC6-8.pdf>. Acesso em: 29 de mar. de 2023.

[37] CONCEIÇÃO, J.C.P.R.; ELLERY JUNIOR, R.G.; CONCEIÇÃO, P.H.Z. Cadeia Agroindustrial do Café no Brasil: agregação de valor e exportação. **Boletim de Economia e Política Internacional**, n. 24, p. 37–47, 2019.

[38] BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade para a Classificação do Café Beneficiado Grão Cru. **Instrução Normativa N° 8, de 11 de junho de 2003**, Brasil, 2003. Disponível em: <<https://abic.com.br/wp-content/uploads/2021/07/Instrucao-Normativa-08-03.pdf>>. Acesso em: 30 de mar. de 2023.

[39] ALVES, S.T.; DIAS, R.C.E.; BENASSI, M.T.; SCHOLZ, M.B.S. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1164–1168, 2006.

[40] SEPÚLVEDA, W.S.; CHEKMAM, L.; MAZA, M.T.; MANCILLA, N.O. Consumers' preference for the origin and quality attributes associated with production of specialty coffees: Results from a cross-cultural study. **Food Research International**, v. 89, p. 997–1003, 2016.

[41] RODARTE, M.P. **Análise sensorial, química e perfil de constituintes voláteis de cafés especiais**. 147 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

[42] MENDES, L.C.; MENEZES, H.C.; SILVA, M.A.A.P. Optimization of the roasting of robusta coffee (*C. canephora* conillon) using acceptability tests and RSM. **Food Quality and Preference**, v. 12, p. 153–162, 2001.

[43] BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Café no Brasil e Ementário do Café**, Brasil, 2022. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>. Acesso em: 29 de mar. de 2023.

- [44] BARBIN, D.F.; FELICIO, A.L.S.M.; SUN, D.W.; NIXDORF, S.L.; HIROOKA, E.Y. Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview. **Food Research International**, v. 61, p. 23–32, 2014.
- [45] TOLESSA, K.; RADEMAKER, M.; BAETS, B. BOECKX, P. Prediction of specialty coffee cup quality based on near infrared spectra of green coffee beans. **Talanta**, v. 150, p. 367–374, 2016.
- [46] COSTA, B.R. Brazilian specialty coffee scenario. **Coffee Consumption and Industry Strategies in Brazil**, v. 3, p. 51–64, 2020.
- [47] SCAA – SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION OF AMERICA. **Protocolo para Análise Sensorial de Café** - Metodologia SCAA, 2008. Disponível em: <http://coffeetraveler.net/wp-content/files/901-SCAA_CuppingProtocols_TSC_DocV_RevDec08_Portuguese.pdf>. Acesso em: 29 de mar. de 2023.
- [48] ABIC – Associação Brasileira da Indústria do Café. **Categorias de qualidade do café: recomendações técnicas ABIC**, 2020. Disponível em: <<https://www.abic.com.br/certificacoes/qualidade/>>. Acesso em: 29 de mar. de 2023.
- [49] PIZARRO, C.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J.M. Mixture resolution according to the percentage of robusta variety in order to detect adulteration in roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 266–276, 2007.
- [50] CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de café, Brasília, DF, v. 10, n. 1, p. 1–40, 2023. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 20 de jan. de 2023.
- [51] SILVA, J.R. **Otimização do processo de torração do café pelo monitoramento de parâmetros e propriedades físicas e sensoriais**. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.
- [52] DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Fennema's Food Chemistry**. 4 Ed. Nova York, Estados Unidos: CRC Press, 2010.
- [53] VIGNOLI, J.A.; VIEGAS, M.C.; BASSOLI, D.G.; BENASSI, M.T. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279–285, 2014.
- [54] ALCANTARA, G.M.R.N.; DRESCH, D.; MELCHERT, W.R. Use of non-volatile compounds for the classification of specialty and traditional Brazilian coffees using principal component analysis. **Food Chemistry**, v. 360, 130088, 2021.
- [55] IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Furfural. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, FR, v. 63, p. 409, 1995. Disponível em: <<https://inchem.org/documents/iarc/vol63/furfural.html>>. Acesso em: 22 de jan. de 2023.

[56] HU, G., HERNANDEZ, M., ZHU, H., SHAO, S. An efficient method for the determination of furan derivatives in apple cider and wine by solid phase extraction and high performance liquid chromatography diode array detector. **Jornal de Cromatografia A**, v. 1284, p. 100–106, 2013.

[57] MELO, E.M.G. **Um método espectrofotométrico para quantificação de furfural em cachaças por extração líquido-líquido**. 78 p. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2014.

[58] VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523–530, 2000.

[59] OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.

[60] FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 60–68, 1998.

[61] SCHULTHEISS, J.; JENSEN, D.; GALENSA, R. Determination of aldehydes in food by high-performance liquid chromatography with biosensor coupling and micromembrane suppressors. **Journal of Chromatography**, v. 880, n. 1–2, p. 233–242, 2000.

[62] CHEN, D.; BU, X.; XU, X.; WANG, B.; ZHANG, M.; GAN, Y.; YUAN, H.; XIA, X. In-pipette-tip kapok fiber-supported liquid extraction/in-situ derivatization coupled with high-performance liquid chromatography for conveniently determining three furfurals. **Food Chemistry**, v. 415, 135788, 2023.

[63] FERNANDES, G.M.; SILVA, W.R.; BARRETO, D.N.; LAMARCA, R.S.; GOMES, P.C.F.L.; PETRUCI, J.F.S.; BATISTA, A.D. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1135, p. 187–203, 2020.

[64] RAMA, E.C.; ABEDUL, M.T.F. Signal detection techniques. **Wearable Physical, Chemical and Biological Sensors**, cap. 4, p. 71–122, 2022.

[65] PINHEIRO, B.R.O. **Imagem por refletância difusa usando iluminação de intensidade espacialmente modulada**. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Física Médica) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2022.

[66] PAQUET-DURAND, O.; SOLLE, D.; SCHIRMER, M.; BECKER, T.; HITZMANN, B. Monitoring baking processes of bread rolls by digital image analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 425–431, 2012.

- [67] LYRA, W.S.; SANCHES, F.A.C.; CUNHA, F.A.S.; DINIZ, P.H.G.D.; LEMOS, S.G.; SILVA, E.C.; ARAUJO, M.C.U. Indirect determination of sodium diclofenac, sodium dipyrone and calcium gluconate in injection drugs using digital image-based (webcam) flame emission spectrometric method. **Analytical Methods**, v. 3, p. 1975–1980, 2011.
- [68] SOROURADDIN, M.H.; SAADATI, M.; MIRABI, F. Simultaneous determination of some common food dyes in commercial products by digital image analysis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 447–452, 2015.
- [69] STOKES, M.; CHANDRASEKAR, M.A.S.; MOTTA, R. A Standard Default Color Space for the Internet: sRGB. Version 1.10., 1996. Disponível em: <<https://www.color.org/sRGB.xalter>>. Acesso em: 30 de abr. de 2023.
- [70] CALEB, J.; ALSHANA, U.; ERTAŞ, N. Smartphone digital image colorimetry combined with solidification of floating organic drop-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of iodate in table salt. **Food Chemistry**, v. 336, 127708, 2021.
- [71] FAN, Y.; LI, J.; GUO, Y.; XIE, L.; ZHANG, G. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171, 108829, 2021.
- [72] SOARES, S.; NUNES, L.C.; MELCHERT, W.R.; ROCHA, F.R.P. Spot test exploiting smartphone-based digital images for determination of biodiesel in diesel blends. **Journal Microchemical**, v. 152, 104273, 2020.
- [73] AL-NIDAWI, M.; ALSHANA, U. Reversed-phase switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction of copper prior to its determination by smartphone digital image colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 104, 104140, 2021.
- [74] GONÇALVES, I.C.; SOARES, S.; ROCHA, F.R.P. Exploiting microdistillation and smartphone-based digital-image colorimetry for determination of protein in foods. **Microchemical Journal**, v. 188, Issue 108461, 2023.
- [75] ZHANG, W.Y.; TIAN, T.; PENG, L.J.; ZHOU, H.Y.; ZHANG, H.; CHEN, H.; YANG, F.Q. A Paper-Base Analytical Device Integrated with Smartphone: Fluorescent and Colorimetric Dual-Mode Detection of β -Glucosidase Activity. **Biosensors**, v. 12, Issue 893, 2022.
- [76] FIRDAUS, M.L.; APRIAN, A.; MEILEZA, N.; HITSMI, M.; ELVIA, R.; RAHMIDAR, L.; KHAYDAROV, R. Smartphone Coupled with a Paper-Based Colorimetric Device for Sensitive and Portable Mercury Ion Sensing. **Chemosensors**, v. 7, Issue 25, 2019.
- [77] SOARES, S.; ROCHA, F.R.P. Spot test for determination of uric acid in saliva by smartphone-based digital images: A new proposal for detecting kidney dysfunctions. **Microchemical Journal**, v. 162, Issue 105862, 2021.

[78] NASCIMENTO, M.C.G.M.; VIEIRA, M.C.R.; ROCHA, F.R.P.; SILVA, T.A.; SUAREZ, W.T. Flow-based green ceramics microdevice with smartphone image colorimetric detection for free chlorine determination in drinking water. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 287, 122096, 2023.

[79] SILVA, A.F.S.; GONÇALVES, I.C.; ROCHA, F.R.P. Smartphone-based digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant. **Food Control**, v. 125, 107956, 2021.

[80] FRANCO, M.O.K.; SUAREZ, W.T.; SANTOS, V.B.; RESQUE, I.S. A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone. **Food Chemistry**, v. 338, 127800, 2021.

[81] LIMA, M.J.A.; SASAKI, M.K.; MARINHO, O.R.; FREITAS, T.A.; FARIA, R.C.; REIAS, B.F.; ROCHA, F.R.P. Spot test for fast determination of hydrogen peroxide as a milk adulterant by smartphone-based digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 157, 105042, 2020.

[82] SANTOS, V.B.; SILVA, E.K.N.; OLIVEIRA, L.M.A. Low cost *in situ* digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits. **Food Chemistry**, v. 285, p. 340–346, 2019.

[83] HELFER, G.A.; MAGNUS, V.S.; BÖCK, F.C.; TEICHMANN, A.; FERRÃO, M.F.; COSTA, A.B. PhotoMetrix: an application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 2, p. 328–335, 2017.

[84] AESCHLIMANN, F.; BETHGE, P.O.; EGGERS, J.H. Zur Colorimetrie des Furfurols. **Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie**, v. 161, p. 324–344, 1958.

[85] GOMES, R.F.A.; COELHO, J.A.S.; AFONSO, C.A.M. Synthesis and Applications of Stenhouse Salts and Derivatives. **Chemistry A European Journal**, v. 24, n. 37, 9170–9186, 2018.

[86] STILLINGS, R.A.; BROWNING, B.L. Photocolorimetric Determination of Furfural. **Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition**, v. 12, n. 9, p. 499–502, 1940.

[87] FRIEDEMANN, T.E.; KEEGAN, P.K.; WITT, N.F. Determination of Furan Aldehydes. Reaction with Aniline in Acetic and Hydrochloric Acid Solutions. **Analytical Biochemistry**, v. 8, p. 300–311, 1964.

[88] MARTINS, F.C.O.L.; ALCANTARA, G.M.R.N.; SILVA, A.F.S.; MELCHERT, W.R.; ROCHA, F.R.P. The role of 5-hydroxymethylfurfural in food and recent advances in analytical methods. **Food Chemistry**, v. 395, Issue 133539, 2022.

[89] SILVA, C.; GARCIA, V.A.S.; FRANCISCATO, L.M.S.S. Ultrasound Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Lichia Peels (*Litchi Chinensis* Sonn.). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 81–96, 2016.

[90] PUBCHEM – National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 237332, 5-Hydroxymethylfurfural**. 2023. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Hydroxymethylfurfural>>. Acesso em: 20 de mai. de 2023.

[91] YUSTE, A.R.; VALLEJO, V.G.; PEÑA, E.B.; ENGEL, T.C.; ORELLANA, G.; BONDI, M.C.M. Furfural Determination with Disposable Polymer Films and Smartphone-Based Colorimetry for Beer Freshness Assessment. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 959–3966, 2016.

[92] YOUNGBURG, G.E.; PUCHER, G.W. Studies on Pentose Metabolism: I. A Colorimetric Method for the Estimation of Furfural. **Journal of Biological Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 741–746, 1924.

[93] ARIFFIN, A.A.; SOOM, R.M.; BOO, H.C.; LOI, C.C.; CHAI, Y.H.; ABDULKARIM, S.M. Detection and determination of furfural in crude palm oil. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 7, n. 2, p. 136–138, 2009.

[94] JANTRA, S.; WAIYSUKSRI, L.; RATTANAMUNEE, P.; RASHATASAKHON, P.; SUKWATTANASINITT, M.; WACHARASINDHU, S. A new colorimetric paper-based detection of furfural vapor as a fuel marker. **Dyes and Pigments**, v. 214, 111210, 2023.

[95] CARVALHO, R.S. **Avaliação da produção de furfural a partir da xilose utilizando catalisadores de nióbio**. p. 93. Dissertação (Mestre em Ciências) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2018.

[96] PUBCHEM – National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 6115, Aniline**. 2023. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aniline>>. Acesso em: 20 de mai. de 2023.

[97] VOGEL, A.I. **Química Analítica Qualitativa**. 5 ed. São Paulo, Brasil: Mestre Jou, 1981.

[98] BORROW, A.; JEFFREYS, E.G. Modifications of the Aniline Acetate - Furfural Method for the Determination of Pentose. **Analyst**, v. 81, n. 967, p. 598–601, 1956.

[99] BEAUDOR, M.; VAUCHEL, P.; PRADAL, D.; ALJAWISH, A.; PHALIP, V. Comparing the efficiency of extracting antioxidant polyphenols from spent coffee grounds using an innovative ultrasound-assisted extraction equipment versus conventional method. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 188, 109358, 2023.

[100] SERNA-JIMÉNEZ, J.A.; TORRES-VALENZUELA, L.S.; VILLARREAL, A.S.; ROLDAN, C.; MARTÍN, M.A.; SILES, J.A.; CHICA, A.F. Advanced extraction of caffeine and polyphenols from coffee pulp: Comparison of conventional and ultrasound-assisted methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 177, 114571, 2023.

[101] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

[102] PORTO, I.S.A.; SANTOS NETO, J.H.; SANTOS, L.O.; GOMES, A.A.; FERREIRA, S.L.C. Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 149, 104031, 2019.

[103] THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, S.L.R. IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.