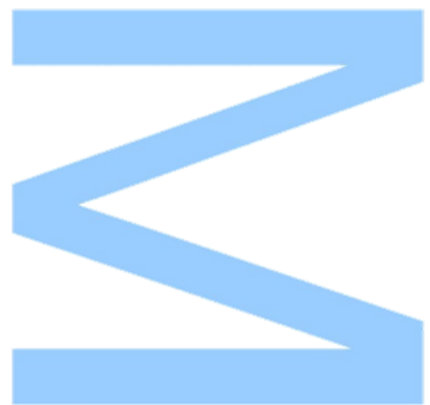
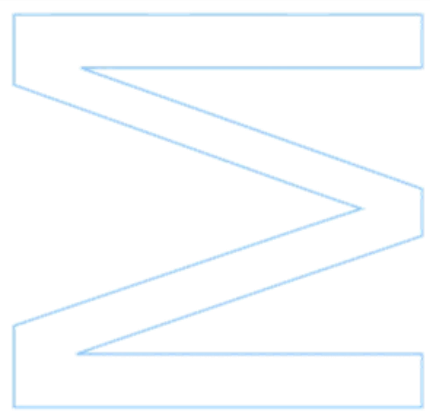


Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de compostos furânicos em maltes baseada num sistema de extração assistida por ventilador

André Frederico de Sequeira Mesmoudi
Ribeiro Coelho

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química
2021



Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de compostos furânicos voláteis em maltes baseada num sistema de extração assistida por ventilador

**André Frederico de Sequeira Mesmoudi
Ribeiro Coelho**

Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química

Departamento de Química e Bioquímica

2021

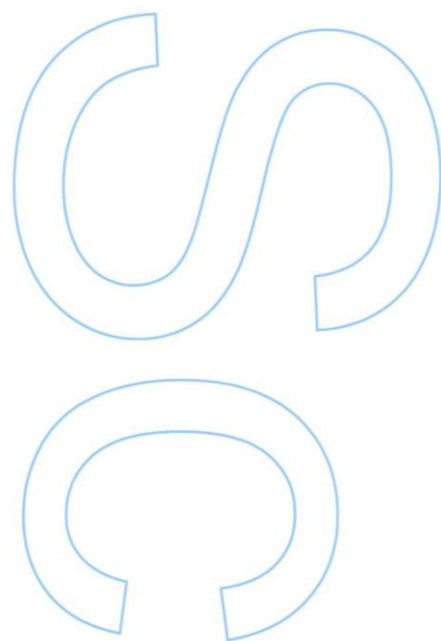
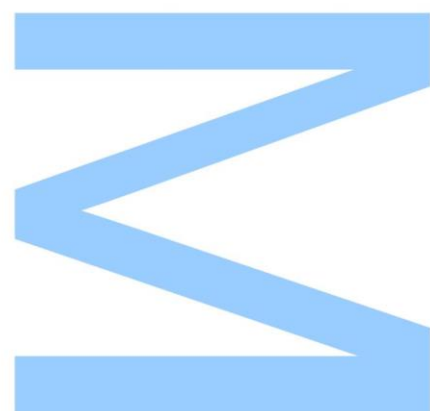
Orientador

Doutor João Rodrigo Santos, Investigador, REQUIMTE/LAQV

Coorientadores

Doutor Daniel Carvalho, Investigador de Pós-Doutoramento, REQUIMTE/LAQV

Professor Doutor Luís Guido, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

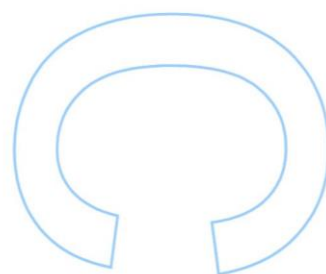
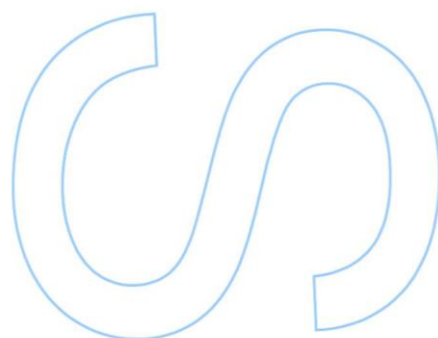
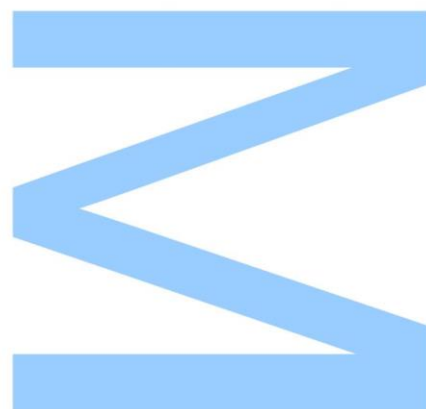




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Resumo

Neste trabalho pretendeu-se identificar e quantificar compostos furânicos voláteis em amostras de malte do tipo *pale*, *brown*, *chocolate* e *black*, recorrendo a uma metodologia analítica baseada num sistema de extração assistida por ventilador. Trata-se de um sistema fechado no qual se coloca a amostra sólida, um recipiente contendo uma solução aceitadora de 2,4-dinitrofenilhidrazina e um ventilador que permite aumentar o transporte de massa por convecção dentro do sistema. Durante a extração os compostos furânicos voláteis são derivatizados nas respetivas hidrazonas. Após a extração, as hidrazonas são analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência e detetados por espectrofotometria de UV/Vis e/ou espectrometria de massa.

Nos estudos realizados com soluções modelo de furfural, verificou-se que a recuperação deste composto no sistema de extração assistida por ventilador foi superior a 75%. Os valores de precisão intradia e entre dias foram, respetivamente, 3,7% e 4,5%. Nos estudos de otimização da extração de furfural em amostras de malte selecionou-se a 2-nonanona como padrão interno da extração. Optou-se pela moagem da amostra por proporcionar sinais cromatográficos mais intensos. Estudou-se a extensão da extração de furfural ao longo do tempo (até 4 horas) e a diferentes temperaturas (20, 30 e 40 °C) tendo-se concluído não ser possível extrair totalmente este composto nas condições ensaiadas. As condições experimentais de extração selecionadas foram 0,25 g de malte moído e uma temperatura de 40 °C. Nestas condições experimentais foi possível identificar o 5-metilfurfural nas amostras de malte torrado com recurso a HPLC-DAD-MS/MS.

Realizaram-se ensaios preliminares para a quantificação de furfural e 5-metilfurfural em amostras de malte pelo método da adição de padrão. Os resultados sugerem a existência de um efeito de matriz associado ao malte. Os teores de furfural e 5-metilfurfural obtidos encontram-se na mesma ordem de grandeza dos valores descritos na literatura.

Palavras-chave: Extração assistida por ventilador; malte; compostos furânicos; 2,4-DNPH; HPLC-UV/Vis.

Abstract

In this paper, the identification and quantification of volatile furanic compounds in *pale, brown, chocolate e black* malt samples based on a fan-assisted extraction system was aimed. The extraction system comprised a closed vessel, which accommodates the solid sample; a reservoir with 2,4-dinitrophenylhydrazine as derivatizing reagent and an electric fan which enables to increase the mass transport through convection inside the closed vessel. During the extraction, the volatile furanic compounds are derivatized to the respective hydrazones. After the extraction, the hydrazones are analyzed by high performance liquid chromatography and detected by UV/Vis spectrophotometry and/or mass spectrometry.

Preliminary assays were performed with model solutions of furfural. The recovery values using the fan-assisted extraction system were higher than 75%. Intraday and interdays precision values of 3.7% and 4.5% were obtained. For furfural extraction optimization studies using malt samples, 2-nonanone was selected as the extraction internal standard. Sample milling was adopted as more intense chromatographic signals were obtained. Furfural extraction's extension over time (up to 4 hours) and under different temperatures (20, 30 and 40 °C) was studied. Full extraction of this compound under these experimental conditions was not reached. The selected extraction conditions for malt analysis were mass of 0.25 g milled malt and temperature of 40 °C. The referred experimental conditions enabled to further identify 5-methylfurfural in roasted malt samples using HPLC-DAD-MS/MS.

Preliminary studies were carried out for the quantification of furfural and 5-methylfurfural in malt samples applying the standard addition method. The results obtained suggested a matrix effect on these samples. The content of furfural and 5-methylfurfural found in the malt samples were within the range of values described in the literature.

Keywords: Fan-assisted extraction system; malt; furanic compounds; 2,4-DNPH HPLC-UV/Vis.

Índice

Resumo	I
Abstract	II
Índice	III
Índice de figuras	V
Índice de tabelas.....	VII
Abreviaturas e símbolos	VIII
1. Introdução.....	1
1.1. Generalidades sobre a cerveja.....	1
1.2. Matérias-primas.....	1
1.3. Cevada e maltagem	3
1.3.1. Cevada	3
1.3.2. Maltagem	4
1.3.3. Tipos de malte torrados	6
1.4. Reações de Maillard.....	6
1.5. Compostos furânicos em maltes	9
1.5.1. Estrutura	9
1.5.2. Mecanismos de formação do 5-hidroximetilfurfural, furfural e 5-metilfurfural	10
1.5.3. Características toxicológicas dos compostos furânicos.....	12
1.6. Metodologias analíticas para a determinação de compostos furânicos em maltes	12
1.7. Sistema de extração de voláteis assistida por ventilador.....	15
1.8. Objetivo	17
2. Parte experimental.....	18
2.1. Instrumentação e reagentes utilizados na preparação de soluções.....	18
2.1.1. Modo de preparação de soluções	19
2.2. Amostras de malte	22
2.2.1. Tipos de malte utilizados.....	22
2.2.2. Moagem e tamisação das amostras de malte	23
2.2.3. Determinação do teor de humidade nas amostras de malte	23
2.3. Extração de voláteis num sistema de extração assistida por ventilador.....	24
2.3.1. Configuração do sistema de extração de voláteis assistida por ventilador .	24
2.3.2. Ensaios de recuperação de furfural com soluções modelo no sistema de extração assistida por ventilador.....	24

2.3.3. Ensaios de extração de compostos voláteis carbonílicos de amostras de malte à temperatura ambiente e sob aquecimento	25
2.3.4. Ensaios preliminares para a quantificação de furfural e 5-metilfurfural em amostras de malte pelo método da adição de padrão.....	27
2.3.5. Ensaios de branco	27
2.3.6. Procedimento de limpeza do sistema de extração de voláteis	27
2.4. Análises cromatográficas	28
3. Resultados experimentais e discussão	29
3.1. Ensaios preliminares	29
3.1.1. Identificação do sinal cromatográfico de furfural-H num sistema HPLC-UV/Vis	29
3.1.2. Curva de calibração para soluções modelo de furfural-H	30
3.1.3. Avaliação do perfil de recuperação de furfural em solução modelo num sistema de extração assistida por ventilador.....	31
3.1.4. Repetibilidade e precisão intermédia do sistema de extração assistida por ventilador com soluções modelo.....	33
3.2. Ensaios com maltes	34
3.2.1. Seleção de um padrão interno	34
3.2.2. Identificação do sinal cromatográfico de furfural-H em amostras de malte.....	35
3.2.3. Avaliação da intensidade do sinal cromatográfico em malte moído vs inteiro	36
3.2.4. Avaliação da proporcionalidade do sinal cromatográfico de furfural-H com a massa de amostra	37
3.2.5. Caracterização da extração do furfural no tempo e com aquecimento	38
3.2.6. Repetibilidade e precisão intermédia do sistema de extração assistida por ventilador com amostras de malte	42
3.2.7. Identificação de compostos furânicos em amostras de malte por HPLC-DAD-MS/MS	43
3.2.8. Identificação do sinal cromatográfico de 5-metilfurfural num sistema HPLC-UV/Vis	44
3.2.9. Curva de calibração de 5-metilfurfural-H em soluções modelo.....	45
3.2.10. Ensaios preliminares para a quantificação de furfural e 5-metilfurfural em amostras de malte pelo método da adição de padrão.....	46
4. Conclusão.....	50
Referências bibliográficas	52

Índice de figuras

Figura 1 - Comparação de cevadas; A – Cevada de 2 fileiras; B – Cevada de 6 fileiras (retirado de [8]).	3
Figura 2 - Processamentos da cevada e etapas do processo de maltagem.	5
Figura 3 - Esquema geral das reações de Maillard (adaptado de [15]).	7
Figura 4 - Estrutura molecular dos compostos furânicos.	10
Figura 5 - Mecanismo de formação do 5-HMF por degradação direta da glucose e da frutose (adaptado de [26]).	10
Figura 6 - Mecanismo de formação do 5-HMF através das reações de Maillard (adaptado de [27]).	11
Figura 7 - Mecanismo de formação de 5-MF e furfural a partir de 5-HMF.	11
Figura 8 – Mecanismo de formação do furfural a partir da frutose (adaptado de [30]).	12
Figura 9 - Metodologias analíticas utilizadas na determinação de compostos furânicos em maltes.	13
Figura 10 - Sistema de extração assistida por ventilador [45]. A - fios elétricos, B – ventilador, C – tampa, D – frasco de 100 mL, E – recipiente contendo solução derivatizante, F – amostra de malte.	15
Figura 11 - Mecanismo de reação geral da 2,4-DNPH com um composto carbonílico e respectiva formação de uma hidrazona (adaptado de [46]).	16
Figura 12 - Fotografia dos componentes do sistema de extração assistida por ventilador. A - fios elétricos, B - tampa equipada com ventilador, C – frasco de 100 mL, D – recipiente para solução aceitadora.	24
Figura 13 - Montagem experimental das extrações de compostos carbonílicos de amostras de malte.	26
Figura 14 - Montagem experimental da extração de compostos voláteis carbonílicos de amostras de malte sob aquecimento.	26
Figura 15 – Identificação do sinal cromatográfico de furfural-H (isômero trans: $t_R = 20,1$ min, isômero cis: $t_R 23,1$ min).	29
Figura 16 - Curva de calibração típica para soluções modelo de furfural-H.	30
Figura 17 - Recuperação de furfural em função do tempo de extração.	32
Figura 18 – Área do sinal cromatográfico de furfural-H, após extração por 15 minutos, em função da concentração da solução modelo ensaiada.	32
Figura 19 - Sobreposição dos cromatogramas solução modelo 2-nonanona-H $1,00 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ (—) e extrato de malte black (—).	34
Figura 20 - Identificação do sinal cromatográfico de furfural ($t_R = 20,1$ min) em amostras de malte black (—), chocolate (—), brown (—) e solução modelo $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ (—).	35
Figura 21 - Sobreposição dos cromatogramas de 10 g de malte black inteiro (—) e 1 g de malte black moído (—).	37
Figura 22 - Estudo da extração do furfural ao longo do tempo sob diferentes temperaturas. A – 20 °C; B – 30 °C; C - 40 °C.	39
Figura 23 – A_{SF}/A_{S2N} em função da massa de malte às diferentes temperaturas ensaiadas.	40
Figura 24 - A_{SF}/A_{S2N} em função da massa de malte black ensaiada.	41

Figura 25 – Identificação do sinal cromatográfico de furfural-H ($t_R = 23,4$ min) e 5-MF-H ($t_R = 32,9$ min) em amostras de malte black (—), chocolate (—), brown (—) e pale (—).	43
Figura 26 - Identificação dos sinais cromatográficos do 5-MF-H ($t_R = 23,8$ min e $t_R = 29,1$)	44
Figura 27 - Curva de calibração típica para soluções modelo de 5-MF-H.	45
Figura 28 - Curvas de calibração associadas ao MAP para o furfural (A) e 5-MF (B). ..	47

Índice de tabelas

Tabela 1 - Valores típicos relativos à composição em carboidratos da cevada (adaptado de [10])	4
Tabela 2 - Tipos de maltes e respetiva cor, teor de humidade e notas aromáticas (adaptado de [12] e [13]).....	6
Tabela 3 - Classes de compostos formados nas reações de Maillard e aromas associados (adaptado de [24])	9
Tabela 4 - Lista dos reagentes e padrões analíticos no trabalho experimental	18
Tabela 5 - Concentrações das soluções modelo utilizadas na identificação do sinal cromatográfico de furfural-H num sistema HPLC-UV/Vis	20
Tabela 6 - Concentrações das soluções modelo preparadas para efeitos de curvas de calibração	21
Tabela 7 - Concentrações das soluções modelo utilizadas nos ensaios de recuperação em soluções modelo no sistema assistida por ventilador	21
Tabela 8 - Volumes da solução mix utilizados na preparação das soluções modelo utilizadas na realização do Método da Adição de Padrão	22
Tabela 9 - Lista dos tipos de maltes utilizados.....	22
Tabela 10 - Valores médios (n=2) de área e tempo de retenção para soluções modelo de furfural-H analisados por HPLC-UV/Vis	30
Tabela 11 - Parâmetros analíticos da curva de calibração do furfural-H.....	31
Tabela 12 - Parâmetros analíticos da curva de calibração nos ensaios de recuperação com soluções modelo	33
Tabela 13 - Valores de RSD (%) associados aos ensaios com aquecimento	41
Tabela 14 - Valores de RSD (%) correspondentes aos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia	42
Tabela 15 - Valores de área e tempo de retenção para soluções modelo de 5-MF-H analisados por HPLC-UV/Vis	45
Tabela 16 - Parâmetros analíticos da curva de calibração do 5-MF-H.....	46
Tabela 17 - Parâmetros analíticos das curvas de calibração associadas ao MAP	47
Tabela 18 - Recuperações de furfural e 5-MF associadas ao MAP	48
Tabela 19 - Teores de furfural e 5-MF corrigidos com o valor de teor de humidade ...	48

Abreviaturas e símbolos

$\frac{A_{SF}}{A_{S2N}}$ – Razão entre as áreas dos sinais cromatográficos de furfural-H e 2-nonanona-H

$\frac{A_{SSM}}{A_{S2N}}$ - Razão entre as áreas dos sinais cromatográficos de 5-metilfurfural-H e 2-nonanona-H

2,4-DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

5-HMF – 5-hidroximetilfurfural

5-HMF-H – Hidrazona formada por reação química entre 5-hidroximetilfurfural e 2,4-dinitrofenilhidrazina

5-MF – 5-metilfurfural

5-MF-H – Hidrazona formada por reação química entre 5-metilfurfural e 2,4-dinitrofenilhidrazina

DAD – Detetor de díodos

Furfural-H – Hidrazona formada por reação química entre furfural e 2,4-dinitrofenilhidrazina

APCI – Ionização química à pressão atmosférica

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

MAP – Método da adição de padrão

MS – Espetrometria de massa

PTFE – Politetrafluoroetileno

RSD – Desvio padrão relativo

SPME – Micro extração em fase sólida

t_R – tempo de retenção

1. Introdução

1.1. Generalidades sobre a cerveja

A cerveja é uma bebida alcoólica fermentada e uma das mais populares a nível mundial. O relato mais antigo de produção de cerveja remonta a cerca de 3500 a.C., na Mesopotâmia [1]. Porém, foi na idade média, mais precisamente no século XII, que a produção de cerveja se modernizou através do uso de lúpulo como aromatizante e conservante por monges alemães da cidade de Hildegarda de Bingen [2]. A Revolução Industrial provocou uma mudança de paradigma na produção de cerveja, marcando a altura a partir da qual esta passou a ser produzida em larga escala num processo industrial [3].

Nos dias de hoje, a cerveja é consumida extensivamente em todo o mundo, tendo-se atingido um consumo total mundial de aproximadamente 189,05 mil milhões de litros no ano de 2019. Segundo dados divulgados pela Kirin Company, a República Checa foi o país onde se registou o maior consumo de cerveja *per capita* neste mesmo ano, situando-se nos 188,6 litros [4]. Comparativamente, em Portugal verificou-se um consumo de 54,9 litros de cerveja *per capita* no mesmo ano.

1.2. Matérias-primas

Independentemente de ser produzida artesanal- ou industrialmente, a cerveja é obtida essencialmente a partir de 4 ingredientes [5]:

- Água: é o ingrediente maioritário e assume um papel importante na sua produção, representando entre 91 e 98% da cerveja. As suas propriedades, nomeadamente a nível de dureza e pH, influenciam a qualidade do produto final pelo que o seu controlo e tratamento antes da sua utilização é de extrema importância. O tratamento pode incluir procedimentos como arejamento, filtração e desmineralização.
- Lúpulo: é uma planta dióica trepadeira, de nome científico *Humulus lupulus*, cultivada em grande parte do hemisfério norte, bem como na Austrália, Nova

Zelândia e África do Sul. Para a produção de cerveja apenas são utilizadas as inflorescências femininas, que contêm nas glândulas de lupulina importantes substâncias tais como resinas e óleos, que contribuem para o aroma e amargor da cerveja. Os compostos responsáveis pela percepção do amargor da cerveja são essencialmente os ácidos- α , que são isomerizados no seus derivados -iso durante a etapa de ebulição do mosto. Estes compostos são também importantes para a formação da espuma e evitam a deterioração rápida da cerveja devido às suas propriedades antissépticas.

- Levedura: utilizam-se essencialmente duas espécies na indústria cervejeira, nomeadamente a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces pastorianus* para a produção de cervejas do tipo *ale* e *lager*, respetivamente. As leveduras têm como função metabolizar os açúcares provenientes do malte em etanol e dióxido de carbono. Como consequência do seu metabolismo, formam-se muitos outros produtos minoritários que contribuem para o aroma da cerveja, dependendo da estirpe utilizada. Assim, a escolha da estirpe a utilizar na fermentação é também de extrema importância tendo em vista as propriedades organoléticas desejadas para o produto final.
- Malte: o malte de cevada é o mais frequentemente utilizado, podendo-se igualmente usar maltes de trigo, centeio, aveia, sorgo ou painço. O malte constitui a fonte de açúcares fermentáveis e contribui também para a cor, aroma e demais propriedades organoléticas da cerveja.

Cada ingrediente envolvido na produção da cerveja tem a sua função e a cerveja não seria a bebida tal como a conhecemos sem esta combinação. Contudo, é evidente a importância que o malte assume na sua produção, tanto por representar a fonte de açúcares fermentáveis, bem como, por contribuir para a cor e aromas específicos da cerveja. Sendo o malte de cevada o mais frequentemente utilizado, este será nos pontos seguintes alvo de uma análise mais pormenorizada.

1.3. Cevada e maltagem

1.3.1. Cevada

A cevada (*Hordeum vulgare*) é um cereal pertencente à família *Gramineae*, que engloba várias espécies de plantas gramíneas presentes tanto em contexto natural como de agricultura e pasto. Segundo a plataforma *Statista*, na colheita de 2020/2021 foram colhidas aproximadamente 160 milhões de toneladas de cevada em todo o mundo [6]. Trata-se de um cereal adaptável e resiliente, sendo encontrado em regiões com clima mediterrânico, bem como em regiões subtropicais, do ártico e do subártico [7]. É utilizado igualmente na alimentação animal e como fonte de açúcares fermentáveis, sob a forma de malte, na produção de bebidas alcoólicas fermentadas.

Existem diferentes variedades de cevada, que podem ser divididas em 2 tipos: inverno e primavera. Para além disso, estes dois tipos de cevada podem ser classificados como de 2 e 6 fileiras, tendo em conta o número e disposição dos grãos nas espigas, tal como representado na figura 1 [8]. A variedade de 2 fileiras é normalmente escolhida para a maltagem e produção de cerveja uma vez que dá origem a sementes maiores e uniformes, bem como a níveis mais baixos de proteínas com vantagens para a produção de cerveja [5].

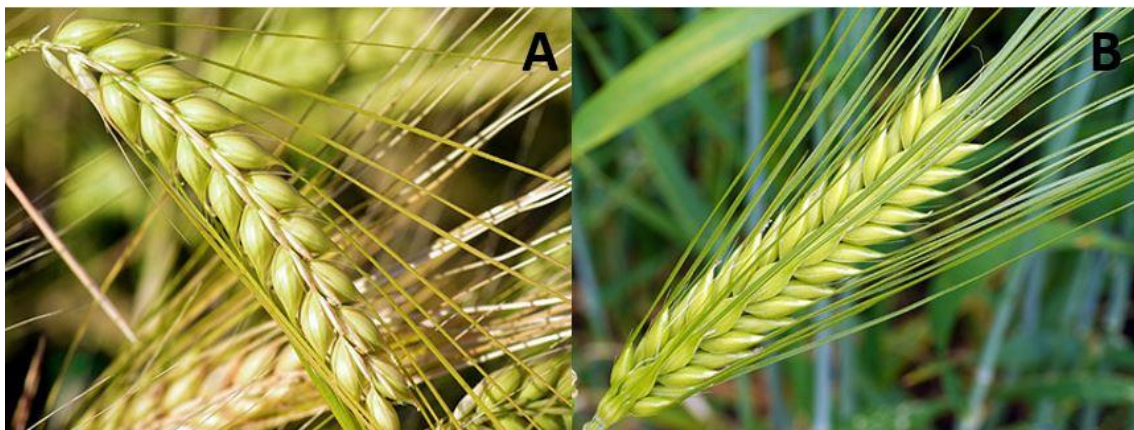


Figura 1 - Comparação de cevadas; A – Cevada de 2 fileiras; B – Cevada de 6 fileiras (retirado de [8]).

Os grãos de cevada são constituídos por polissacáridos amiláceos (amilopectina e amilose) e não amiláceos (β -glucanos, pentosanos e celulose), açúcares simples, proteínas, lípidos e outros constituintes minoritários, nomeadamente compostos fenólicos, minerais e vitaminas [9]. A sua constituição em termos de polissacáridos e

açúcares simples é objeto de grande importância, tendo em conta que a cevada é utilizada na produção de cerveja como fonte de açúcares fermentáveis. Na tabela 1 apresentam-se os valores típicos quanto à constituição em carboidratos na cevada.

Tabela 1 - Valores típicos relativos à composição em carboidratos da cevada (adaptado de [10])

Açúcares simples (%)	Total	Glucose	Frutose	Sacarose
	2,0 – 3,0	0,1- 0,2	0,1	1,9 – 2,2
Polissacáridos amiláceos (%)	Total	Amilose		
	57 - 59	22 - 26		
Polissacáridos não amiláceos (%)	Fibra	Pentosanos	β-glucanos	Celulose
	19-23	5,9	3 - 7	4,3

A maioria dos carboidratos presentes na cevada encontra-se sob a forma de polissacáridos amiláceos. Como tal, a cevada é submetida a um processo, antes da sua utilização na produção de cerveja, que tem em vista a degradação destes polissacáridos em açúcares simples passíveis de sofrer fermentação: a maltagem.

1.3.2. Maltagem

O malte é produzido a partir dos grãos de cevada através de um processo denominado de maltagem, composto por três etapas principais, resumidamente descritas em seguida e representadas na figura 2 [11]:

- **Molha:** esta etapa tem como objetivo aumentar o teor de humidade dos grãos de cevada até 43-46% de modo a dar início ao processo de germinação. Tipicamente, após a limpeza e seleção dos grãos de cevada para garantir a sua homogeneidade, estes são mergulhados em água durante 6 a 16 horas, seguido de um período de repouso ao ar durante 12-24 horas, no qual o ar é renovado de modo a promover o contacto dos grãos com o oxigénio, bem como remover o dióxido de carbono formado na respiração dos grãos. Por fim, os grãos são mergulhados novamente em água durante 10-20 horas, até se atingir o teor de humidade pretendido. Esta etapa é cuidadosamente desenhada de modo a obter-se uma distribuição homogénea de água por todos os grãos.

- **Germinação:** nesta etapa dá-se o desenvolvimento do embrião acompanhada pela formação de enzimas e aumento da atividade enzimática (nomeadamente das enzimas alfa- e beta-amílase, beta-glucanases e enzimas proteolíticas). Neste processo ocorre a degradação enzimática das paredes celulares, das proteínas e do amido, ficando os açúcares e demais nutrientes disponíveis para as fases posteriores da produção da cerveja. Os grãos são mantidos a uma temperatura compreendida entre 16 e 20 °C com circulação de ar. Esta etapa é controlada pelo desenvolvimento físico dos grãos: quando as radículas atingem dimensões de aproximadamente 75% do comprimento do grão, interrompe-se o processo resultando assim o denominado malte verde ou malte imaturo.
- **Secagem:** os grãos de malte verde são submetidos a um tratamento térmico com o objetivo de reduzir o teor de humidade e, conseqüentemente, interromper o processo de germinação, numa etapa com uma duração aproximada de 24 horas. O crescimento dos grãos é suspenso e a atividade enzimática é inibida. Numa primeira fase, recorre-se a um fluxo de ar a uma temperatura compreendida entre 50 e 60 °C de modo a reduzir o teor de humidade para cerca de 12%. Numa segunda fase, eleva-se a temperatura a 75-110 °C para reduzir ainda mais o teor de humidade. Por fim, dá-se uma etapa de arrefecimento.

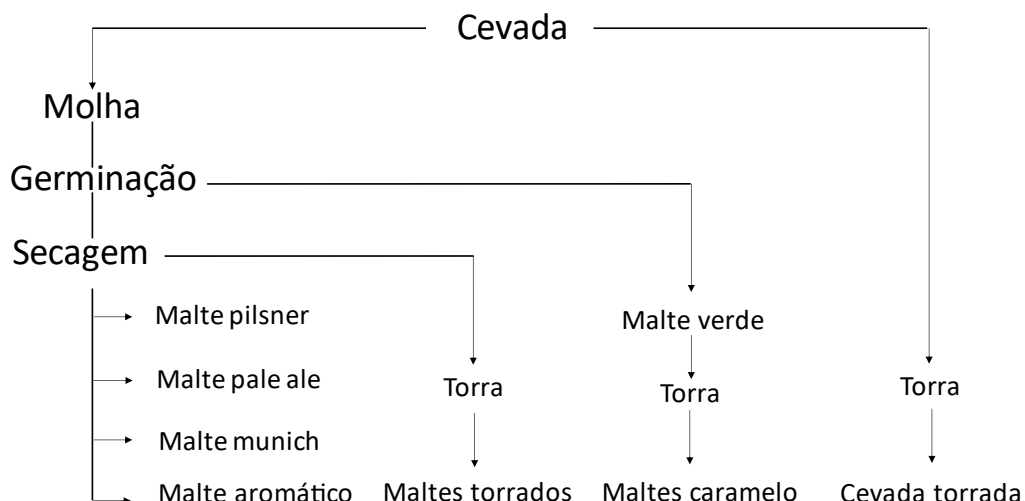


Figura 2 - Processamentos da cevada e etapas do processo de maltagem.

1.3.3. Tipos de malte torrados

Dependendo do tipo de malte a ser produzido, os grãos de malte podem ser submetidos a uma etapa de torra sob condições de temperatura e tempo bem definidos. Esta etapa permite obter maltes com cores e aromas específicos para a produção de diferentes estilos de cerveja. Dependendo das condições de secagem e torra, podem ser obtidos diferentes tipos de malte com aromas e cores específicos (tabela 2). De um modo geral, quanto mais alta a temperatura selecionada, mais escuro é o malte resultante, obtendo-se notas aromáticas diferentes em função deste parâmetro. Maltes especiais, como os maltes caramelo e torrado, apresentam cores e aromas mais intensos uma vez que são expostos a temperaturas superiores a 145°C e 230°C, respetivamente. Fruto destas temperaturas elevadas às quais o malte é sujeito, ocorrem as reações de Maillard que serão resumidamente abordadas no ponto seguinte.

Tabela 2 - Tipos de maltes e respetiva cor, teor de humidade e notas aromáticas (adaptado de [12] e [13])

Matéria-prima	Processo	Tipo de malte	Cor / °EBC	Teor de humidade (%)	Notas aromáticas
Malte <i>pale</i>	Torra	<i>Amber</i>	48 - 96	< 3,5	Seco, cozido, nozes, biscoito
		<i>Chocolate</i>	1200-1440	< 3,0	<i>Mocha</i> , melaço, <i>chocolate</i>
		<i>Black</i>	1440-1680	< 3,0	Fumado, café
Malte <i>verde</i>	Torra	<i>Cara</i>	25 - 40	< 7,5	Doce, caramelo, nozes
		<i>Crystal</i>	90 - 360	~ 3,5	Malte, caramelo
		<i>Dark crystal</i>	120 - 150	< 3,5	Café queimado, caramelo
		<i>Caramel</i>	260 - 320	< 3,5	Café queimado, caramelo
Malte <i>verde</i>	Secagem	<i>Munich</i>	10 - 15	~ 3,8	Granulado, malte (intenso)
		<i>Vienna</i>	7 - 10	~ 4,5	Granulado, malte (subtil)

1.4. Reações de Maillard

As reações de Maillard são um conjunto de reações muito complexas entre aminoácidos e açúcares redutores, em condições de elevada temperatura, tendo sido descritas pela primeira vez em 1912 pelo médico e químico francês Louis-Camille

Maillard [14]. Estas reações encontram-se sobretudo associadas a alimentos processados envolvendo torra, grelha e cozedura, conferindo-lhes uma cor acastanhada, bem como aromas característicos. Na figura 3 apresenta-se um esquema geral das reações de Maillard.

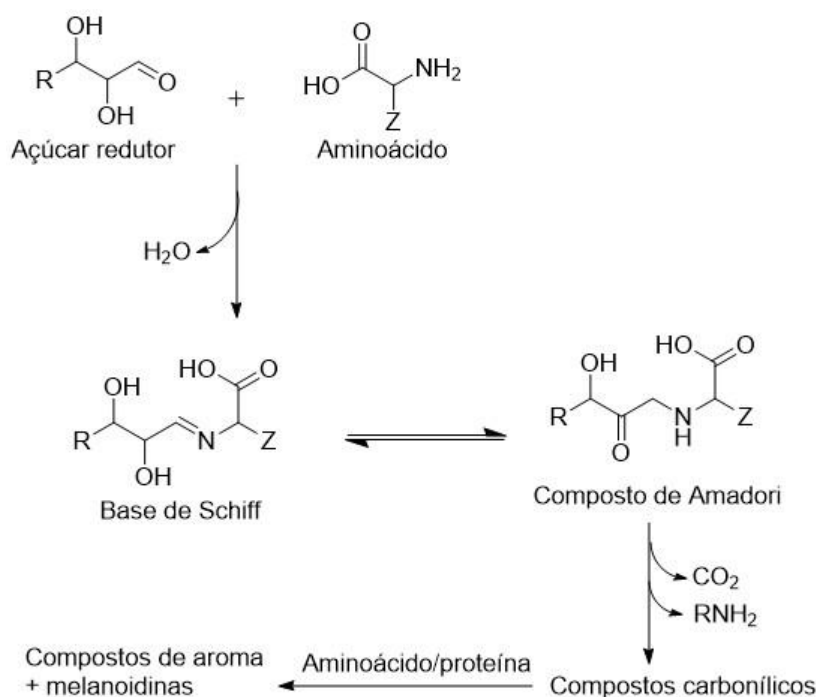


Figura 3 - Esquema geral das reações de Maillard (adaptado de [15]).

As reações de Maillard estão associadas ao desenvolvimento de cores acastanhadas, por consequência da formação de melanoidinas, que são pigmentos responsáveis pela cor de alimentos e.g. o pão e o mel [16]. Este desenvolvimento de cor é de extrema importância visto que é uma propriedade desejável que atrai o consumidor para vários produtos alimentares [17]. Para além disso, o processamento dos alimentos aumenta a sua qualidade sensorial através de alterações na textura, sabor e aroma.

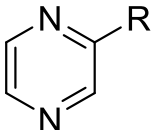
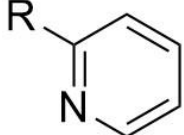
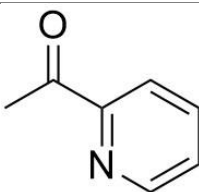
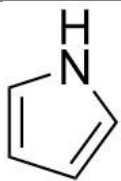
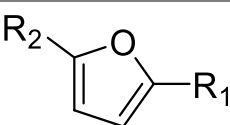
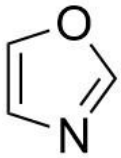
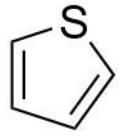
Sendo a cor um parâmetro indissociável destas reações, esta é correntemente utilizada como um indicador simples da extensão das reações de Maillard. Contudo, numa perspetiva de monitorizar, numa matriz complexa, alterações químicas provenientes destas reações ou mesmo reações específicas inseridas neste leque diverso, este indicador revela-se insuficiente. Neste contexto, existem trabalhos desenvolvidos no sentido de utilizar classificações de cor mais sistemáticas, bem como relacioná-la com propriedades físicas e/ou químicas. Numa perspetiva de caracterizar o

desenvolvimento de cores causado pelas reações de Maillard, MacDougall e Granov determinaram a cor no espaço CIELAB em diferentes misturas de açúcares redutores e aminoácidos, aquecidas em condições alcalinas, a partir dos respetivos espectros UV/Vis [18]. No mesmo âmbito, Morales et al. estudaram a extensão das reações de Maillard em amostras de leite sujeitas a aquecimento, através da monitorização de intermediários com propriedades fluorescentes [19].

Durante as reações de Maillard, ocorre a formação de diferentes classes de compostos (tabela 3) com propriedades benéficas para a saúde como as melanoidinas, mas também de compostos indesejáveis responsáveis por *off-flavours*, bem como de outros que podem apresentar um risco para a saúde como a acrilamida e os compostos furânicos [20]. Entre os vários compostos já identificados que se formam nas reações de Maillard, alguns demonstram propriedades de bioatividade, nomeadamente antioxidante e tóxica. No campo da bioatividade antioxidante, encontra-se descrita a presença de compostos fenólicos na cerveja, os quais demonstram uma reatividade apreciável com radicais livres [21]. Por outro lado, a formação de acrilamida é um exemplo clássico de um produto da reação de Maillard com propriedades tóxicas, nomeadamente de neurotoxicidade, carcinogenicidade e hepatotoxicidade [22].

Por fim, é de extrema importância o desenvolvimento de aromas associados aos produtos das reações de Maillard. A formação dos compostos responsáveis pelos diferentes aromas está dependente de parâmetros como a composição química inicial do alimento ao nível de açúcares e aminoácidos, a temperatura, o tempo, o pH, e/ou teor de humidade [23]. Na tabela 3 apresentam-se as classes de compostos formados nas reações de Maillard bem como os aromas associados.

Tabela 3 - Classes de compostos formados nas reações de Maillard e aromas associados (adaptado de [24])

Classe de compostos	Estrutura molecular	Aromas associados
Pirazinas		Torrado, tostado, cereais torrados
Alquilpiridinas		Amargo, adstringente, queimado
Acilpiridinas		Biscoito
Pirroles		Cereais
Furanos		Doce, queimado, pungente, caramelo
Oxazóis		Nozes, doce
Tiofenos		Carne

1.5. Compostos furânicos em maltes

1.5.1. Estrutura

Os compostos furânicos são moléculas heterocíclicas de baixo peso molecular derivados da reação de Maillard durante o tratamento térmico dos alimentos. Estes contribuem para as propriedades sensoriais dos alimentos e, por isso, são

inclusivamente muito utilizados na indústria alimentar para melhorar o aroma e sabor dos alimentos [25].

Dependendo dos substituintes no anel furânico, podemos encontrar compostos furânicos como o furfural, 5-metilfurfural (5-MF) e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF):

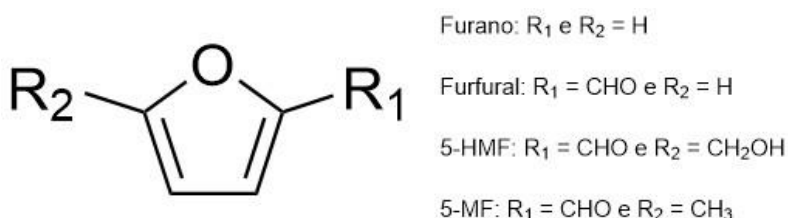


Figura 4 - Estrutura molecular dos compostos furânicos.

1.5.2. Mecanismos de formação do 5-hidroximetilfurfural, furfural e 5-metilfurfural

A ocorrência de compostos furânicos em maltes está relacionada com o tratamento térmico subjacente aos processos de secagem e torra e, por consequência, com as reações de Maillard. Dada a complexidade destas reações, dá-se a formação de uma grande variedade de substâncias também responsáveis pela cor e aromas, tal como referido anteriormente (ponto 1.4).

O 5-HMF pode formar-se por degradação direta de açúcares, nomeadamente a glucose e a frutose, em condições ácidas e temperatura alta, formando-se em maior quantidade e mais rapidamente a partir da frutose [26]. Assim, alimentos com um maior teor de frutose apresentarão um maior teor de 5-HMF. Na figura 5 apresenta-se o mecanismo proposto da formação do 5-HMF a partir da glucose e da frutose.

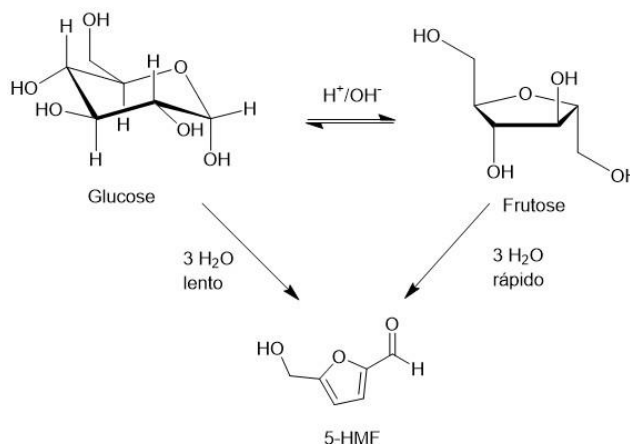


Figura 5 - Mecanismo de formação do 5-HMF por degradação direta da glucose e da frutose (adaptado de [26]).

O 5-HMF também se forma nas reações de Maillard, sob as condições de temperatura e teor de humidade a estas associadas. Na figura 6 apresenta-se o mecanismo de formação de 5-HMF proposto por Capuano e Fogliano [27].

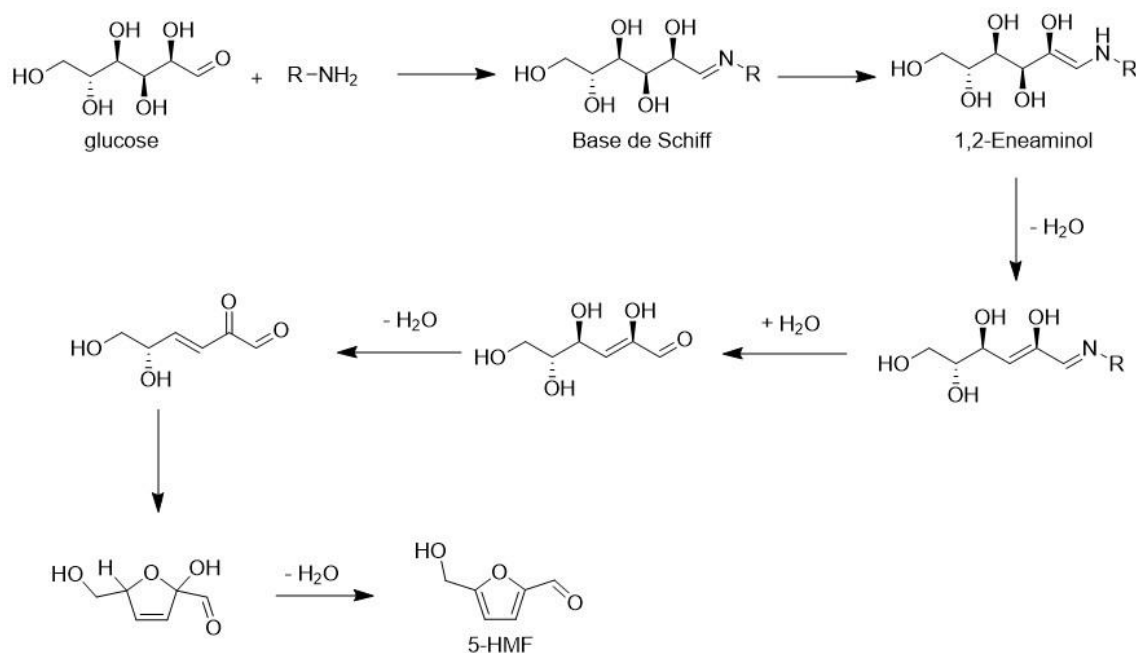


Figura 6 - Mecanismo de formação do 5-HMF através das reações de Maillard (adaptado de [27]).

Os mecanismos descritos de formação do furfural são por decomposição do 5-HMF tal como descrito por Merlo et al. [28] e Nikolov & Yaylayan [29] (figura 7), sendo este último mecanismo igualmente aceite como via de formação de 5-MF, ou, alternativamente, por degradação da frutose [30] (figura 8).

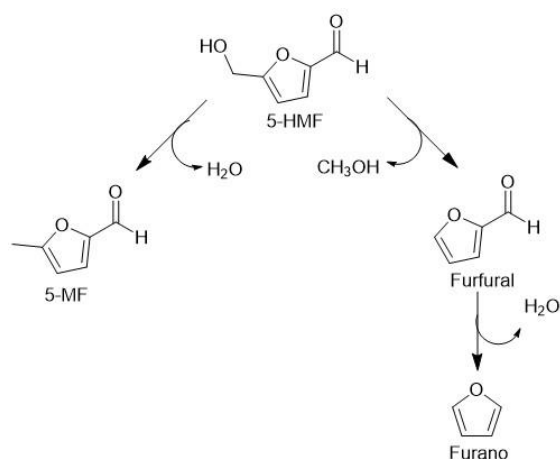


Figura 7 - Mecanismo de formação de 5-MF e furfural a partir de 5-HMF.

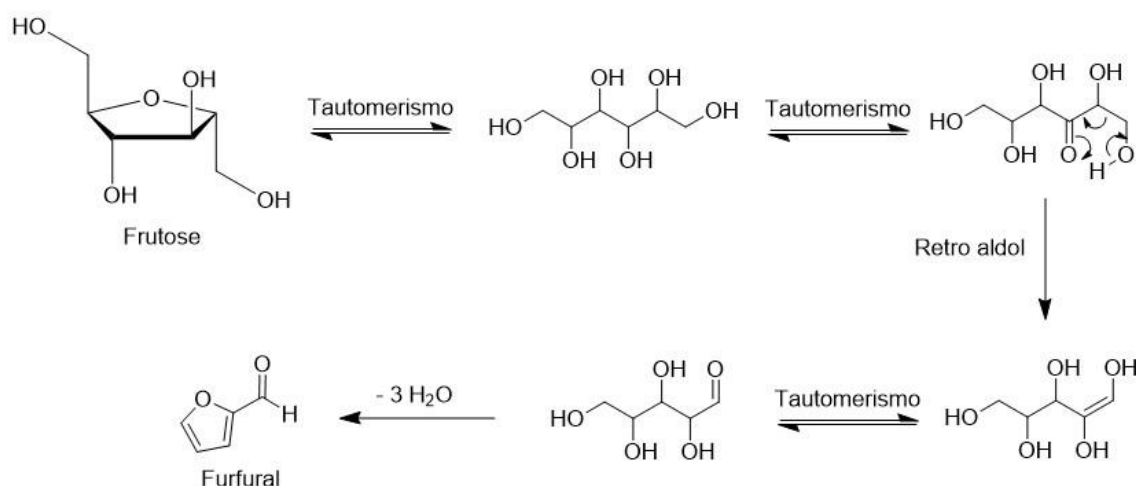


Figura 8 – Mecanismo de formação do furfural a partir da frutose (adaptado de [30]).

1.5.3. Características toxicológicas dos compostos furânicos

O 5-HMF revelou possuir propriedades mutagénicas num estudo *in-vivo* [31]. É caracterizado por uma toxicidade aguda reduzida, tendo sido observada uma dose letal de 3100 mg/kg de peso corporal em ratas por via oral [32]. No decorrer da metabolização do 5-HMF, este pode ainda ser convertido em 5-sulfoximetilfurfural, um composto com propriedades genotóxicas demonstradas num estudo *in-vivo* [33], [34].

Tal como descrito por Jonker, o furfural demonstrou propriedades hepatotóxicas num estudo *in-vivo* em ratas [35]. Em 2004, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) estabeleceu, para o furfural, um limite diário aceitável de 500 µg/kg de peso corporal em seres humanos [35]. Como descrito por Hernandez et al. e assumindo um consumo moderado, a cerveja não se revela prejudicial, estando a exposição ao furfural abaixo do limite diário em todas as cervejas que foram objeto de estudo [36]. Finalmente, encontra-se descrita, para o 5-MF, uma dose letal de 2200 mg/kg em ratas, por via oral [37].

1.6. Metodologias analíticas para a determinação de compostos furânicos em maltes

Têm sido vários os métodos descritos na literatura para a determinação de compostos furânicos em maltes. Considerando os trabalhos publicados constata-se que

apenas uma metodologia foi encontrada que ilustra a determinação de compostos furânicos em malte diretamente sobre a amostra sólida [38]. As restantes metodologias descritas envolvem invariavelmente um passo de extração sólido-líquido seguindo-se geralmente uma extração por SPME e análise por GC-MS. Apenas em 2 trabalhos foi realizada a quantificação de furfural, através de GC/MS. Os restantes estabelecem uma relação entre o sinal deste analito com propriedades físicas do malte ou com o tratamento térmico do malte, tendo-se utilizado para este efeito técnicas como GC/MS, HPLC-UV e APCI-MS.

Na figura 9 apresenta-se um esquema geral ilustrativo das metodologias analíticas para a determinação de compostos furânicos em maltes.

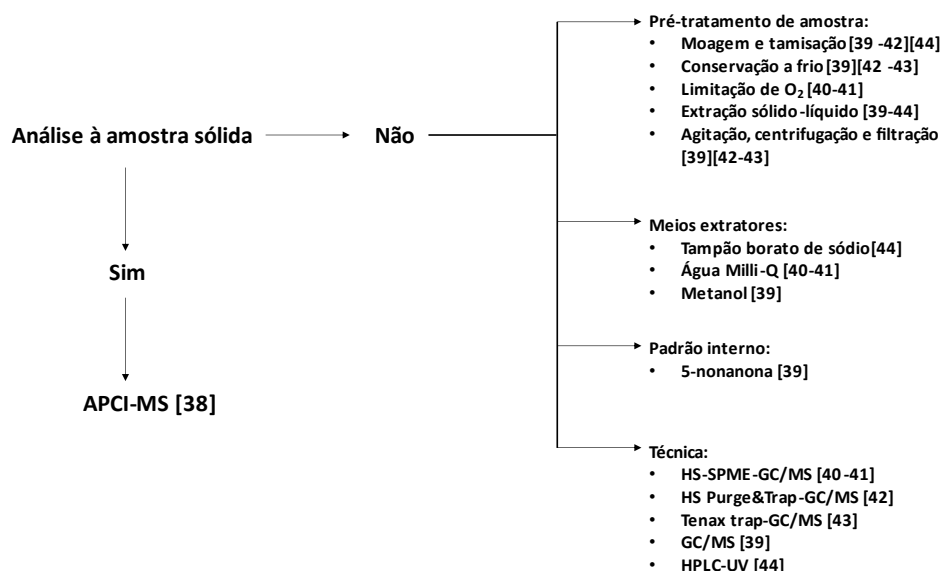


Figura 9 - Metodologias analíticas utilizadas na determinação de compostos furânicos em maltes.

A título ilustrativo, descreve-se mais pormenorizadamente o procedimento envolvido em algumas metodologias mais recentes:

Baseado na técnica GC-MS, Yahya et al. monitorizaram o desenvolvimento do perfil aromático em maltes ao longo do processo de torrefação [39]. O tratamento da amostra envolveu a moagem do malte, seguida de extração sólido-líquido com metanol contendo 5-nonanona como padrão interno, bem como posterior agitação e centrifugação. Para as amostras de cevada torrada, malte *black* e malte *crystal* foi determinado um teor de furfural de 9,76 µg/g, 9,54 µg/g e 2,10 µg/g, respetivamente. Foi também determinado, para as mesmas amostras, um teor de 5-MF de 6,55 µg/g, 4,47 µg/g e 0,78 µg/g.

Através de HS-SPME-GC/MS, Filipowska et al. determinaram furfural e outros aldeídos em maltes *pale* [40]. O tratamento de amostra consistiu na moagem do malte e extração sólido-líquido com água ultrapura, com a subsequente extração por HS-SPME. Determinou-se um teor de furfural inferior a 1000 µg / kg. Também com recurso à técnica de HS-SPME-GC/MS e com um pré-tratamento de amostra semelhante, Trueba et al. monitorizaram aldeídos cisteínados e aldeídos livres, entre os quais o furfural, durante o processo de fabrico de cerveja e posterior envelhecimento [41]. Foram utilizadas amostras de maltes de cevada *Pilsner* e *Biscuit*. Verificou-se um aumento do teor de furfural aquando do envelhecimento da cerveja.

Com recurso a APCI-MS, Channell et al. monitorizaram a formação de compostos voláteis, entre os quais o furfural, associada ao tratamento térmico do malte [38]. A determinação destes compostos foi realizada diretamente sobre a amostra sólida, tendo-se estudado quatro temperaturas de torra, sob condições secas e húmidas. Verificou-se sob condições mais secas uma formação mais extensa de furfural e 5-MF.

Recorrendo à técnica de HS-Purge and Trap-GC/MS, Kim et al. determinaram diversos compostos aromáticos, incluindo o furfural, em maltes torrados [42]. O tratamento da amostra envolveu a moagem do malte e o armazenamento do mesmo a uma temperatura de 4 °C, seguindo-se uma extração sólido-líquido com água e posterior centrifugação e filtração. Verificou-se um teor de furfural mais elevado nas amostras de malte mais intensamente torradas.

Utilizando *Tenax trap*-GC/MS, Woffenden et al. determinaram quinze compostos voláteis em maltes torrados, relacionando o seu teor com a atividade antioxidante e a cor [43]. O pré-tratamento da amostra envolveu mergulhar o malte em dinitrogénio líquido durante 15 minutos previamente ao passo de moagem, tendo-se realizado uma extração sólido-líquido com tampão acetato, seguida de centrifugação e filtração. Encontrou-se uma relação entre a cor do malte e o teor de furfural: quanto maior a sua cor EBC, maior o seu teor.

Aplicando HPLC-UV, Hellwig e Henle determinaram furfural, entre outros produtos das reações de Maillard, em diversos tipos de maltes [44]. O tratamento de amostra envolveu a moagem e tamisação do malte, bem como a extração sólido-líquido com tampão borato de sódio. Estabeleceu-se uma correlação entre a cor do malte e o teor de furfural, 5-HMF, entre outros produtos das reações de Maillard.

De um modo geral, as metodologias analíticas utilizadas na extração e identificação de compostos voláteis, bem como na determinação de compostos

furânicos em maltes, revelaram-se eficazes e sensíveis. Contudo, são morosas e com procedimentos de extração complexos, envolvendo operações como extração com solventes, centrifugação e filtração. Como tal, propõe-se aqui um sistema que simplifica a extração dos compostos voláteis em amostras de malte.

1.7. Sistema de extração de voláteis assistida por ventilador

Este sistema baseia-se na extração de compostos voláteis num sistema fechado, onde se coloca no interior do frasco a amostra sólida bem como um recipiente contendo uma solução aceitadora contendo um derivatizante, no caso concreto, 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH). Com o ventilador elétrico em funcionamento, a fase gasosa dentro do frasco circula mais rapidamente e os compostos voláteis da amostra são extraídos para a solução aceitadora de 2,4-DNPH. Após um período de tempo definido, o extrato é analisado por HPLC-UV/Vis e/ou por HPLC-DAD-MS/MS.

O sistema de extração assistida por ventilador aqui proposto (figura 10) tem assim como principal objetivo, aumentar a convecção na fase gasosa do interior do sistema fechado, o que possibilita, por transporte de massa, que os compostos voláteis da amostra possam ser extraídos pela solução aceitadora num período de tempo mais curto. Trata-se de uma estratégia alternativa, relativamente aos procedimentos convencionais baseados em extração com solventes, e cuja eficiência foi constatada num trabalho anteriormente realizado e publicado [45]. Nesse trabalho explora-se este sistema de extração na caracterização do perfil carbonílico volátil de café verde, tendo sido observado um aumento da eficiência de extração mínima de 50% por ação do ventilador.

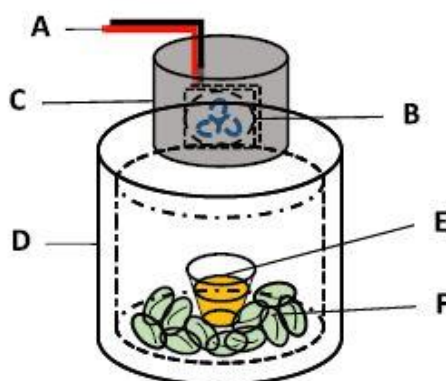


Figura 10 - Sistema de extração assistida por ventilador [45]. A - fios elétricos, B – ventilador, C – tampa, D – frasco de 100 mL, E – recipiente contendo solução derivatizante, F – amostra de malte

A reação de derivatização de compostos carbonílicos com 2,4-DNPH trata-se de uma reação química muito bem estabelecida [46]. Baseia-se na reação entre o grupo amina do composto 2,4-DNPH com o grupo carbonilo, em meio ácido, obtendo-se como produto de reação uma hidrazona. Esta estratégia apresenta como principal vantagem a elevada velocidade da reação de derivatização de aldeídos e cetonas em misturas complexas, e a elevada seletividade. Uma vez que as hidrazonas formadas absorvem radiação na zona do espectro de radiação UV-Vis, é possível realizar a determinação destes compostos por recurso a sistemas convencionais de HPLC-UV/Vis.

Na figura 11 apresenta-se o mecanismo de reação geral da 2,4-DNPH com um composto carbonílico.

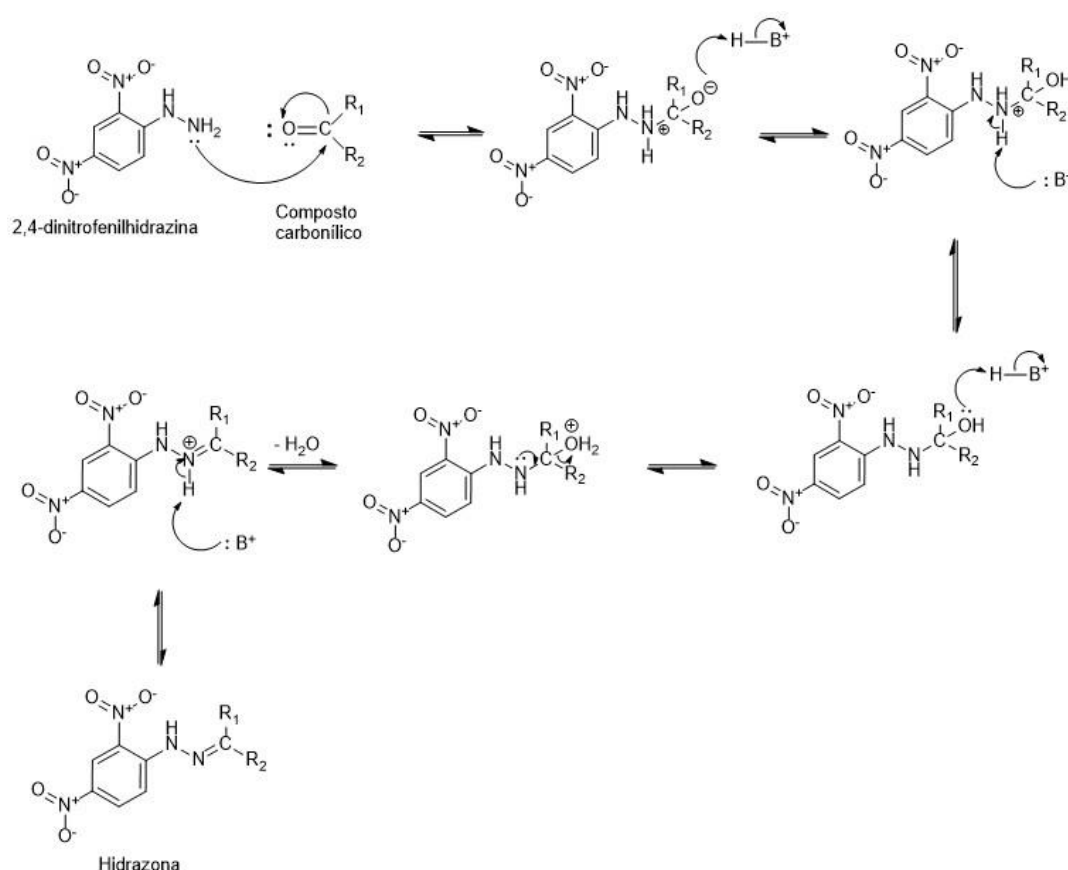


Figura 11 - Mecanismo de reação geral da 2,4-DNPH com um composto carbonílico e respetiva formação de uma hidrazona (adaptado de [46]).

Em meio ácido, a hidrazona resultante encontra-se presente sob a forma de dois estereoisómeros *cis* e *trans* devido à existência da ligação dupla C=N . Por esse motivo, na análise destes compostos por HPLC-UV/Vis, poderá obter-se 2 sinais por cada

composto derivatizado, relativos aos dois estereoisómeros formados, correspondendo habitualmente o sinal mais intenso ao isómero *trans* [46].

1.8. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica baseada num sistema de extração assistida por ventilador para a determinação de compostos furânicos em amostras de malte. A identificação e quantificação destes analitos será feita com recurso a HPLC-UV/Vis e/ou HPLC-DAD-MS/MS. Após o desenvolvimento da metodologia, esta será aplicada a diferentes tipos de malte de modo a avaliar o impacto de diferentes condições de torra na formação destes compostos.

2. Parte experimental

2.1. Instrumentação e reagentes utilizados na preparação de soluções

Para a pesagem rigorosa de massas foi utilizada uma balança analítica *Mettler AE50*. Para a pesagem não rigorosa de massas foi utilizada uma balança semi-analítica *Mettler PE 2000*.

Para a medição rigorosa de volumes de soluções inferiores a 5,00 mL foram utilizadas micropipetas *Gilson Pipetman P10, P100, P200, P1000 e P5000*.

Para a medição de volumes superiores a 5 mL foi utilizado material de vidro aferido.

A água ultrapura utilizada na preparação da solução de derivatizante 2,4-DNPH e fase móvel foi obtida a partir de um sistema de purificação de água *Millipore Direct-Q 3 UV*.

Os reagentes utilizados na preparação das soluções utilizadas estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Lista dos reagentes e padrões analíticos no trabalho experimental

Reagente	Qualidade e pureza	Marca e referência
Ácido acético	<i>Suprapur</i> ®, 100%	Merck, 100066
Ácido clorídrico	<i>Analytical grade</i> , 37%	Fisher Chemical, H/1200/PB17
Acetonitrilo	<i>HPLC gradient grade</i> , ≥ 99,9%	Fisher Chemical, A998-1
Acetato de amónio	<i>Reagent grade</i> , ≥ 98%	Sigma-Aldrich, A7262
2,4-DNPH	65-70%	Acros Organics, AC117060250
Furfural	≥ 99%	Acros Organics, AC181100250
5-MF	<i>ReagentPlus</i> ®, 99%	Sigma-Aldrich, 137316
2-nonanona	Padrão analítico, ≥ 99.5%	Sigma-Aldrich, 63969

2.1.1. Modo de preparação de soluções

A. Solução tampão acetato 10 mmol.L⁻¹ 1% acetonitrilo

Num balão volumétrico de 1 L, adicionou-se uma pequena quantidade de água ultrapura, 0,8 g de acetato de amónio, 600 µL de ácido acético glacial e 10 mL de acetonitrilo. Agitou-se a solução resultante até completa homogeneização de todos os reagentes. Por fim, adicionou-se água ultrapura até perfazer o volume de 1 L.

B. Soluções de furfural, 5-metilfurfural e 2-nonanona

As soluções padrão mãe de furfural e 5-MF de concentração 0,100 mol.L⁻¹ foram preparadas pipetando respetivamente 207 e 249 µL do reagente, para um balão volumétrico de 25 mL e aferindo este volume com acetonitrilo. Estas soluções foram conservadas a 4 °C.

A solução padrão mãe de 2-nonanona de concentração 1,0×10⁻² mol.dm⁻³, foi preparada pipetando 43,4 µL de padrão analítico de 2-nonanona para um balão volumétrico de 25 mL e aferindo o volume com acetonitrilo. Esta solução foi conservada a 4 °C.

C. Solução de derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina (0,3% m/v) 2-nonanona-H 1,0×10⁻⁵ mol.L⁻¹

Para um frasco de 25 mL previamente tarado pesou-se 0,075 g de 2,4-DNPH, adicionou-se 12,5 mL de acetonitrilo e agitou-se modo a garantir a solubilização completa do composto. De seguida adicionou-se 12,5 mL de uma solução de ácido clorídrico 40 mmol.L⁻¹, homogeneizou-se a solução resultante e deixou-se em repouso durante um dia. Ao fim deste período de tempo, pipetaram-se 20,0 mL de solução para um frasco de 25 mL e adicionaram-se 20 µL de uma solução padrão mãe de 2-nonanona.

Esta solução foi preparada semanalmente.

D. Soluções utilizadas na identificação do sinal cromatográfico de furfural-H num sistema HPLC-UV/Vis

Para a identificação do sinal cromatográfico de furfural-H, a partir da solução padrão mãe de furfural preparou-se uma solução padrão intermédia de furfural de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, pipetando 250 μL para um balão volumétrico de 25 mL e aferindo o volume com acetonitrilo. De seguida, prepararam-se as soluções modelo a ser injetadas, pipetando diferentes volumes da solução padrão intermédia para uma solução de 2,4-DNPH 0,3% (m/v) em água:acetonitrilo, 1:1, (v/v), sendo o volume final, 1 mL. Na tabela 5 encontram-se sistematizadas as concentrações das soluções agora mencionadas.

Tabela 5 - Concentrações das soluções modelo utilizadas na identificação do sinal cromatográfico de furfural-H num sistema HPLC-UV/Vis

Volume de solução intermédia / μL	Volume final / mL	Concentração final / mol.L^{-1}
5	1,00	$5,0 \times 10^{-6}$
10	1,00	$1,0 \times 10^{-5}$
20	1,00	$2,0 \times 10^{-5}$

E. Soluções de furfural-H e 5-MF-H utilizadas na obtenção das curvas de calibração

Para a obtenção de curvas de calibração com soluções modelo, a partir das soluções padrão mãe de furfural e 5-MF prepararam-se cinco soluções intermédias de diferentes concentrações, por diluição rigorosa em acetonitrilo. De seguida, prepararam-se as soluções modelo a ser injetadas, pipetando 5,00 μL de solução intermédia para 495 μL de solução de 2,4-DNPH 0,3% (m/v) em água:acetonitrilo, 1:1, (v/v), para uma ampola de 2 mL. Na tabela 6 encontram-se sistematizadas as concentrações das soluções agora mencionadas.

Tabela 6 - Concentrações das soluções modelo preparadas para efeitos de curvas de calibração

Volume de solução padrão mãe de furfural ou 5-MF 0,100 mol.L⁻¹ / μL	Concentração da solução intermédia / mol.L⁻¹	Concentração da solução injetada / mol.L⁻¹ (Volume final = 500 μL)
57,0	$5,70 \times 10^{-3}$	$5,70 \times 10^{-5}$
114	$1,14 \times 10^{-2}$	$1,14 \times 10^{-4}$
228	$2,28 \times 10^{-2}$	$2,28 \times 10^{-4}$
342	$3,42 \times 10^{-2}$	$3,42 \times 10^{-4}$
456	$4,56 \times 10^{-2}$	$4,56 \times 10^{-4}$

F. Soluções utilizadas nos ensaios de recuperação de furfural em soluções modelo no sistema assistida por ventilador

Para realizar os ensaios de recuperação de furfural em soluções modelo no sistema assistida por ventilador, prepararam-se quatro soluções modelo, a partir da solução padrão mãe de furfural 0,100 mol.L⁻¹, por diluição rigorosa com acetonitrilo. Na tabela 7 encontram-se sistematizadas as concentrações das soluções modelo aqui referidas.

Tabela 7 - Concentrações das soluções modelo utilizadas nos ensaios de recuperação em soluções modelo no sistema assistida por ventilador

Volume de solução padrão mãe de furfural 0,100 mol.L⁻¹ / μL	Volume final / mL	Concentração da solução modelo utilizada no ensaio de recuperação / mol.L⁻¹
5	10,00	$5,00 \times 10^{-5}$
10	10,00	$1,00 \times 10^{-4}$
10	1,00	$1,00 \times 10^{-3}$
20	1,00	$2,00 \times 10^{-3}$

G. Soluções utilizadas na realização do Método da Adição de Padrão

A partir das soluções padrão mãe de furfural e 5-MF, preparou-se uma solução contendo os aldeídos furfural e 5MF (solução *mix*) de concentração $0.0500 \text{ mol.L}^{-1}$. A partir desta solução, por diluição rigorosa e com um volume final de 1 mL, prepararam-se quatro soluções modelo de concentrações $1,14 \times 10^{-2}$, $2,28 \times 10^{-2}$, $3,42 \times 10^{-2}$ e $4,56 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em acetonitrilo, tal como descrito na tabela 8.

Tabela 8 - Volumes da solução *mix* utilizados na preparação das soluções modelo utilizadas na realização do Método da Adição de Padrão

Volume de solução mix furfural e 5-MF $0,05 \text{ mol.L}^{-1} / \mu\text{L}$	Volume final / mL	Concentração final / mol.L^{-1}
228	1,00	$1,14 \times 10^{-2}$
456	1,00	$2,28 \times 10^{-2}$
684	1,00	$3,42 \times 10^{-2}$
912	1,00	$4,56 \times 10^{-2}$

2.2. Amostras de malte

2.2.1. Tipos de malte utilizados

Na tabela 9 estão listadas as amostras de malte utilizadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Para estas amostras são igualmente apresentados os valores de temperatura de torra e cor de acordo com a respetiva informação cedida pelo fornecedor.

Tabela 9 - Lista dos tipos de maltes utilizados

Tipo de malte	Temperatura de torra	Cor / °EBC
Malte <i>pale</i>	Não aplicável	4,5 - 7
Malte <i>brown</i>	Até 220 °C	105 - 145
Malte <i>chocolate</i>	Até 230 °C	1070 - 1310
Malte <i>black</i>	Até 230 °C	1400 – 1800

Estes tipos de malte foram selecionados com base nas condições de torra a que são submetidas, de modo a ter-se um conjunto de amostras com representatividade quanto à intensidade de torra a que são sujeitas. Assim, o malte *pale* não é submetido a torra, o malte *brown* é submetido a uma torra intermédia, e os maltes *chocolate* e *black* são submetidos a uma torra intensa.

2.2.2. Moagem e tamisação das amostras de malte

Transferiu-se aproximadamente 35 g de malte inteiro para o moinho elétrico (*Kunft KCG4380*). Em seguida, procedeu-se à moagem durante ca. 5 segundos. Findo este tempo, o malte foi tamisado com o auxílio de dois peneiros, de *mesh* 18 e 33 (*Endecott's Ltd*), recolhendo-se a fração compreendida entre estes valores de granulometria. O malte tamisado foi transferido para um frasco de 100 mL, ficando fechado e armazenado ao abrigo da luz até posterior análise.

2.2.3. Determinação do teor de humidade nas amostras de malte

O teor de humidade nas amostras de malte foi determinado segundo o procedimento descrito pela European Brewery Convention (EBC) – *Moisture Content of Malt* [47]. Baseado na metodologia descrita pesou-se numa balança analítica, para uma folha de alumínio, 5 g de malte moído e colocou-se o mesmo numa estufa, pré-aquecida a 105°C durante 3 horas. Findo este período de tempo, retirou-se a amostra para um exsiccador durante 20 minutos de modo que a amostra ficasse à temperatura ambiente. Por fim, pesou-se novamente a amostra e o teor de humidade foi determinado pela seguinte expressão:

$$\text{Teor de água (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

, onde m_1 = massa, expressa em gramas, da amostra antes da secagem e m_2 = massa, expressa em gramas, da amostra após secagem.

2.3. Extração de voláteis num sistema de extração assistida por ventilador

2.3.1. Configuração do sistema de extração de voláteis assistida por ventilador

O sistema de extração (figura 12) foi montado com o seguinte material: um frasco de 100 mL (*Schott, GL 45, 218012458*) munido de uma tampa de rosca (*Schott, GL 45*) no interior da qual foi colocado um septo de PTFE (*Duran Wheaton Kimble, para GL 45, ref. 29 248 28 06*), um recipiente em PTFE para acomodação da solução aceitadora de 2,4-DNPH, e um ventilador elétrico (*Coolerguys, 25×25×10 mm, IP67, 12 V*). A tampa de rosca e o septo foram perfurados de modo a permitir a passagem dos fios elétricos do ventilador para alimentação elétrica do mesmo. O ventilador ficou suspenso pelos fios elétricos e posicionado junto à tampa de rosca. Na figura 12 ilustram-se os componentes do sistema de extração aqui descrito.

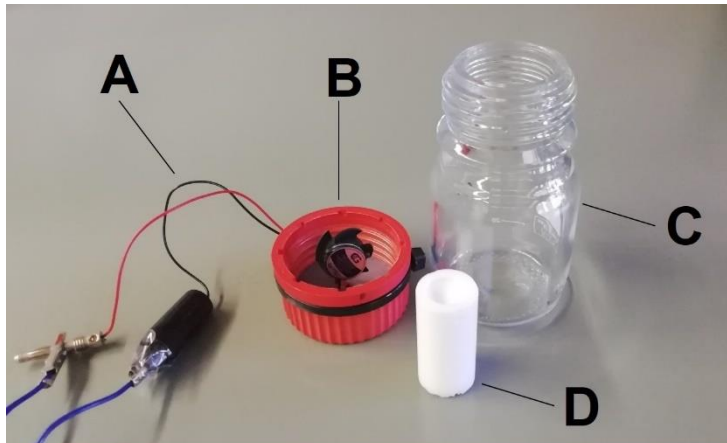


Figura 12 - Fotografia dos componentes do sistema de extração assistida por ventilador. A - fios elétricos, B - tampa equipada com ventilador, C - frasco de 100 mL, D - recipiente para solução aceitadora

2.3.2. Ensaio de recuperação de furfural com soluções modelo no sistema de extração assistida por ventilador

Colocou-se dentro do frasco o reservatório da solução de 2,4-DNPH e no seu interior 500 μ L de solução aceitadora de 2,4-DNPH. Para o fundo do frasco pipetou-se

um volume de 5 μ L, das soluções descritas no ponto 2.1.1, espalhando-o tanto quanto possível de modo a facilitar a sua volatilização. Fechou-se imediatamente o frasco com a tampa equipada com a ventilador, e colocou-se esta última em funcionamento dando-se simultaneamente início à contagem do tempo de extração. Findo este tempo de extração, desligou-se a ventilador, abriu-se o frasco e transferiu-se a solução aceitadora para uma ampola de 2 mL de modo a ser analisado por HPLC-UV/Vis.

Paralelamente a este ensaio, misturou-se numa ampola de 2 mL o mesmo volume de solução modelo anteriormente utilizado (5 μ L) juntamente com 495 μ L de solução de derivatizante 2,4-DNPH, homogeneizando-se a solução resultante, para ser igualmente analisada por HPLC-UV/Vis

A recuperação de furfural foi calculada como a razão entre o sinal cromatográfico de furfural obtido no ensaio de recuperação e o sinal cromatográfico de furfural obtido sem o procedimento de extração.

2.3.3. Ensaio de extração de compostos voláteis carbonílicos de amostras de malte à temperatura ambiente e sob aquecimento

O procedimento experimental para a extração dos compostos voláteis do malte foi similar ao anteriormente descrito nos ensaios de recuperação com soluções modelo. No primeiro passo, pesou-se rigorosamente uma massa de malte. Depois, transferiu-se essa amostra para o sistema de extração. De seguida, colocou-se dentro do frasco o recipiente para acomodação da solução aceitadora tendo-se então pipetado 500 μ L de solução aceitadora de 2,4-DNPH. Fechou-se o frasco com a tampa equipada com a ventilador e deu-se início à contagem do tempo de extração no instante em que o ventilador é ligado. Findo este tempo de extração, desligou-se a ventilador, abriu-se o frasco e transferiu-se o extrato para uma ampola de 2 mL de modo a ser analisado por HPLC-UV/Vis e/ou por HPLC-DAD-MS/MS.

A figura 13 ilustra a montagem experimental efetuada para uma amostra de malte.

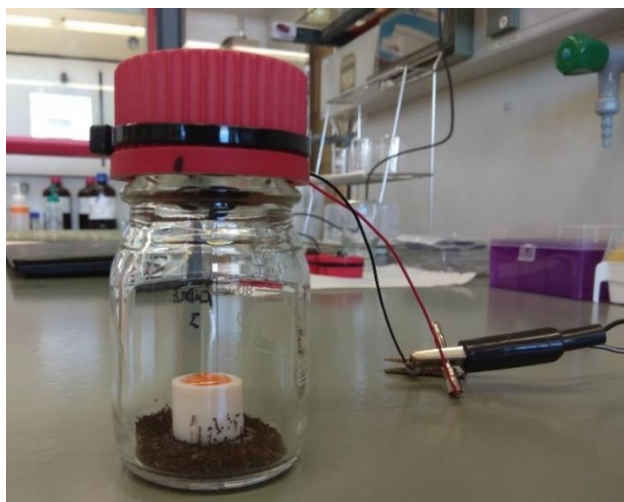


Figura 13 - Montagem experimental das extrações de compostos carbonílicos de amostras de malte.

Para a realização dos procedimentos experimentais de extração com aquecimento da amostra foi utilizada uma placa de aquecimento (*Corning PC-420D*) e um banho-maria. A placa de aquecimento é ligada deixando-se a temperatura da água do banho estabilizar. Atingida a temperatura definida, o procedimento de montagem do sistema de extração, extração e recolha e análise do extrato é igual ao descrito anteriormente, sendo o sistema de extração colocado no banho durante o tempo de extração definido (figura 14).

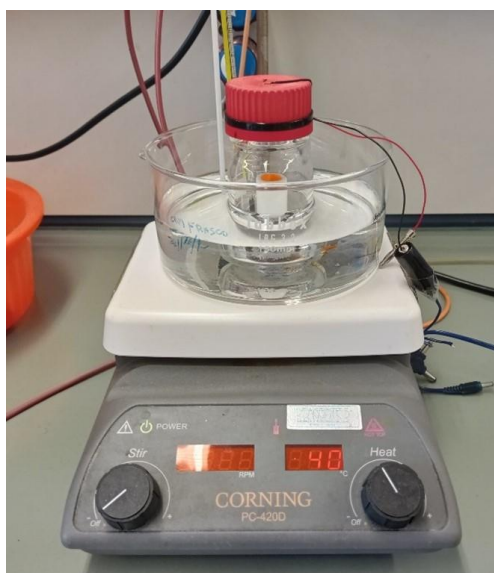


Figura 14 - Montagem experimental da extração de compostos voláteis carbonílicos de amostras de malte sob aquecimento.

2.3.4. Ensaios preliminares para a quantificação de furfural e 5-metilfurfural em amostras de malte pelo método da adição de padrão

O procedimento experimental efetuado para a realização do método de adição de padrão para cada amostra de malte, foi o seguinte: pesaram-se rigorosamente 5 porções de 0,25 g de malte moído para ampolas de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 5 µL de cada uma das quatro soluções padrão (ponto 2.1.1) respetivamente para cada ampola. À restante ampola foi adicionado 5 µL de uma solução água:acetonitrilo, 1:1. Fecharam-se as ampolas e deixaram-se as amostras dopadas num agitador orbital durante 12 horas a fim de permitir a incorporação dos compostos carbonílicos na amostra. Findo o período de tempo associado à agitação, realizou-se a extração de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.3.3, à temperatura de 40 °C.

2.3.5. Ensaios de branco

De modo a avaliar a ocorrência de possíveis interferências no procedimento experimental, realizaram-se ensaios de branco antes e no fim de cada conjunto de ensaios de extração com soluções modelo ou amostras de malte. Para o efeito, procedeu-se do seguinte modo. Dentro do frasco colocou-se o recipiente de solução aceitadora e, no seu interior, 500 µL de solução de 2,4-DNPH. Fechou-se o frasco com a tampa equipada com a ventilador e deu-se início à contagem do tempo de extração no cronómetro no instante em que a ventilador é ligada. Ao fim deste período de tempo de extração, desligou-se a ventilador, abriu-se o frasco e transferiu-se o extrato para uma ampola de modo a ser analisado por HPLC-UV/Vis.

2.3.6. Procedimento de limpeza do sistema de extração de voláteis

Após cada extração, realizou-se a limpeza do sistema de extração de modo a prevenir contaminações entre ensaios. O procedimento experimental seguido consistiu em lavar o recipiente de solução aceitadora com uma mistura de água e acetonitrilo 1:1, o frasco com água destilada e deixar a tampa com ventoinha ao ar durante 15 minutos, com esta em funcionamento. Após a secagem dos componentes lavados, o sistema de extração pode ser utilizado para uma nova extração.

2.4. Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema HPLC *Jasco LC-200 Plus*, constituído por um amostrador automático (*AS-2055 Plus*), uma bomba quaternária (*PU-2089 Plus*) e um detetor UV/Vis (*UV-2070 Plus*). Foi utilizada uma fase estacionária C_{18} , nomeadamente, uma pré-coluna da Phenomenex (4×3 mm) e uma coluna da Phenomenex Gemini ($150 \times 4,6$ mm, $3 \mu\text{m}$, (tamanho de poro)). As análises cromatográficas decorreram utilizando-se como fase móvel acetonitrilo (A) e solução tampão acetato 10 mM (pH 4,8) (B) em modo gradiente, respeitando a seguinte variação de composição de fase móvel: composição inicial (0 min), 50% de A e 50% de B; ao fim de 20 min, 65% de A e 35% de B; ao fim de 45 min, 100% de A e 0% de B; ao fim de 50 min, 50% de A e 50% de B; Durante um período adicional de 5 minutos, manteve-se a última composição da fase móvel para condicionamento prévio da coluna relativamente à análise da amostra seguinte. Utilizou-se um caudal de fase móvel constante de 0,45 mL/min, um volume de injeção de 25 μL , e um comprimento de onda de deteção de 360 nm. A aquisição de dados foi levada a cabo utilizando-se o *software Chrompass* versão 1.8.6.1 (Jasco).

A identificação dos compostos carbonílicos foi realizada utilizando-se um sistema HPLC-DAD-ESI-MS/MS (Finnigan Surveyor Plus, Thermo Electron Corporation), constituído por um amostrador automático, uma bomba quaternária e um detetor de díodos a operar a 220-500 nm. As condições de eluição utilizadas foram iguais às descritas acima para as análises cromatográficas no sistema HPLC-UV/Vis, sendo o volume de injeção também 25 μL . O espectrómetro de massa (*Finnigan LCQ Deca XP Plus*) está equipado com uma fonte de ESI e um detetor quadrupolo de massa de iões. A fonte de iões foi utilizada em modo negativo com temperatura do capilar de 325 °C, gás auxiliar (N_2) a 23 (unidades arbitrárias), diferença de potencial na fonte a 5 kV e diferença de potencial do capilar a 15 V. A deteção foi realizada para um intervalo de massa compreendido entre 160 e 500 m/z. A aquisição de dados foi realizada com o *software XCalibur* versão 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

3. Resultados experimentais e discussão

3.1. Ensaaios preliminares

Os ensaios preliminares foram realizados considerando apenas o composto furfural. Apesar de estar descrita a presença de outros compostos furânicos em maltes, esta opção deveu-se por motivos de simplicidade na execução experimental.

3.1.1. Identificação do sinal cromatográfico de furfural-H num sistema HPLC-UV/Vis

Para a identificação do sinal cromatográfico de furfural-H num sistema HPLC-UV/Vis preparam-se 3 soluções modelo de furfural-H de concentrações $5,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de acordo com o procedimento experimental descrito no ponto 2.1.1. Estas soluções modelo foram injetadas no sistema HPLC-UV/Vis, e analisadas de acordo com o método de eluição anteriormente descrito (2.4). Na figura 15 apresenta-se a sobreposição dos cromatogramas correspondentes às soluções modelo.

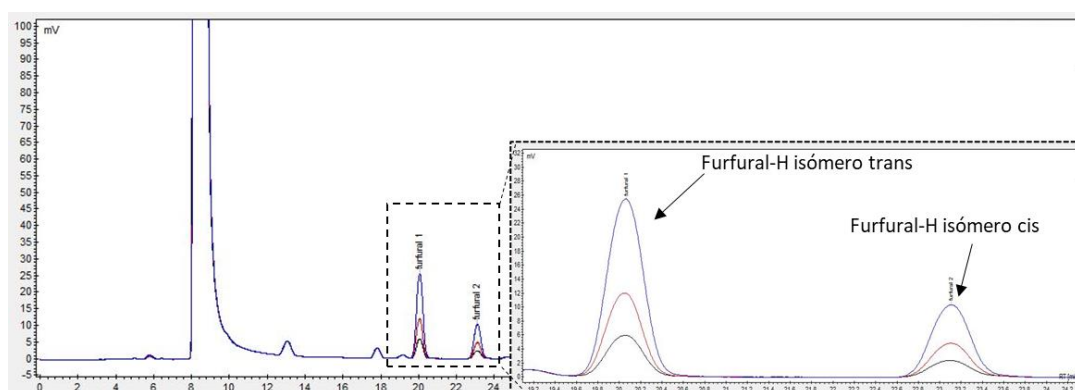


Figura 15 – Identificação do sinal cromatográfico de furfural-H (isómero trans: $t_R = 20,1$ min, isómero cis: $t_R = 23,1$ min).

Como era expectável, o furfural-H dá origem a dois sinais cromatográficos correspondentes aos isómeros cis e trans. Sendo o sinal correspondente ao isómero trans o mais intenso, este será considerado como o sinal cromatográfico de furfural-H

em todos os ensaios. O estudo seguinte consistiu na obtenção de uma curva de calibração para soluções modelo de furfural-H.

3.1.2. Curva de calibração para soluções modelo de furfural-H

Para a caracterização, quanto à linearidade, do sinal cromatográfico do furfural-H num sistema de HPLC-UV/Vis, prepararam-se diferentes soluções deste composto num intervalo de concentrações compreendido entre $5,70 \times 10^{-5}$ e $4,56 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de acordo com o procedimento experimental descrito no ponto 2.1.1. As soluções modelo preparadas em duplicado foram injetadas no HPLC e analisadas de acordo com o método de eluição anteriormente descrito (ponto 2.4). Na tabela 10 apresentam-se os dados típicos obtidos para um conjunto de soluções modelo preparadas. Na figura 16 apresenta-se a curva de calibração obtida para soluções modelo de furfural-H.

Tabela 10 - Valores médios (n=2) de área e tempo de retenção para soluções modelo de furfural-H analisados por HPLC-UV/Vis

[Furfural] / mol.L ⁻¹	Área / mV.min	Tempo de retenção / min
$5,70 \times 10^{-5}$	37,40	19,73
$1,14 \times 10^{-4}$	72,08	19,82
$2,28 \times 10^{-4}$	142,36	19,85
$3,42 \times 10^{-4}$	211,54	19,90
$4,56 \times 10^{-4}$	273,13	19,93

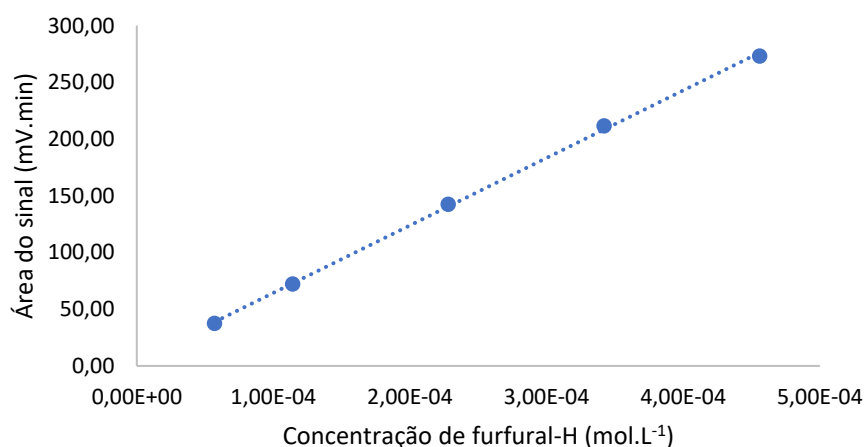


Figura 16 - Curva de calibração típica para soluções modelo de furfural-H.

A partir dos resultados obtidos calcularam-se os parâmetros analíticos da curva de calibração, de acordo com o descrito por Miller e Miller [48] (Tabela 11).

Tabela 11 - Parâmetros analíticos da curva de calibração do furfural-H

Declive	$5,95 \times 10^5 \pm 2,82 \times 10^4 \text{ mV.min.mol}^{-1}.\text{L}$
Ordenada na origem	$4,92 \pm 7,91 \text{ mV.min}$
Coefficiente de correlação	0,9997

De acordo com os resultados obtidos foi possível observar uma correlação linear entre a intensidade do sinal medido e a concentração, bem como repetibilidade relativamente ao tempo de retenção do furfural. Estes resultados permitiram assim avançar para o estudo preliminar seguinte, que consistiu na caracterização do perfil de recuperação de furfural a partir de soluções modelo no sistema de extração assistida por ventilador.

3.1.3. Avaliação do perfil de recuperação de furfural em solução modelo num sistema de extração assistida por ventilador

De modo a caracterizar o sistema de extração proposto, avaliou-se o perfil de recuperação do furfural neste sistema, preparando-se 4 soluções modelo de concentração $5,00 \times 10^{-5}$, $1,00 \times 10^{-4}$, $1,00 \times 10^{-3}$ e $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ segundo o procedimento descrito no ponto 2.1.1. A justificação para os níveis de concentração ensaiados tem dois motivos: por um lado, utilizando concentrações menores que $5,00 \times 10^{-5}$, o sinal cromatográfico é muito reduzido; por outro lado, não se prevê que as amostras de malte possuam um teor de furfural mais elevado que se traduza numa intensidade de sinal superior à obtida para a concentração mais elevada, presumindo uma recuperação de 100% deste composto em ensaios de extração utilizando uma massa de amostra de 1 g. Realizaram-se os ensaios de recuperação segundo o procedimento descrito em 2.3.2, tendo sido estudados seis tempos de extração diferentes, nomeadamente 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min. Todas as extrações foram realizadas em duplicado. As soluções amostra resultantes foram analisadas no sistema HPLC-UV/Vis. A recuperação foi calculada, tal como descrito no ponto 2.3.2. Na figura

17 apresenta-se o gráfico ilustrativo da recuperação de furfural em função do tempo de extração.

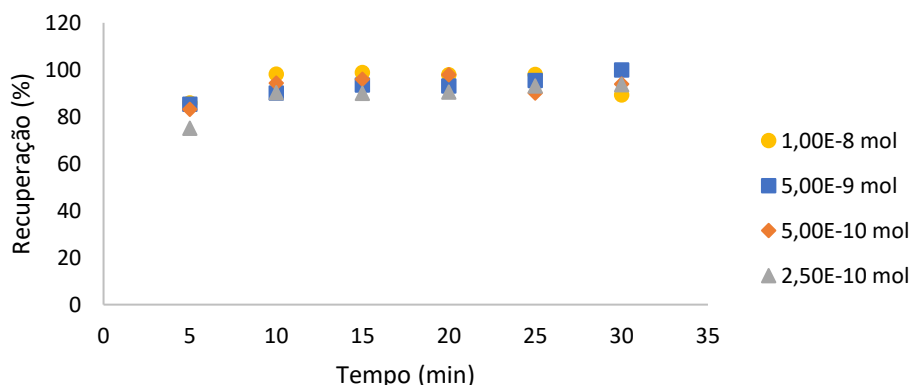


Figura 17 - Recuperação de furfural em função do tempo de extração.

Analisando o gráfico da figura 17, verifica-se que o perfil de recuperação é similar para as quatro concentrações ensaiadas de solução modelo. A partir de ca. 10 minutos de extração atinge-se um planalto na recuperação do furfural, em que os valores de recuperação foram superiores a 80%. Assim, para efeitos de escolha das condições experimentais que possibilitem um aumento da robustez da metodologia, selecionou-se 15 minutos como o tempo de extração a utilizar em ensaios seguintes. Este valor é objetivamente o primeiro ponto experimental pertencente ao planalto referido. Na figura 18 apresenta-se o gráfico da área do sinal cromatográfico de furfural-H, ao fim de 15 minutos de extração, em função da concentração de solução modelo ensaiada. Na tabela 12 apresentam-se os parâmetros analíticos da curva de calibração obtida.

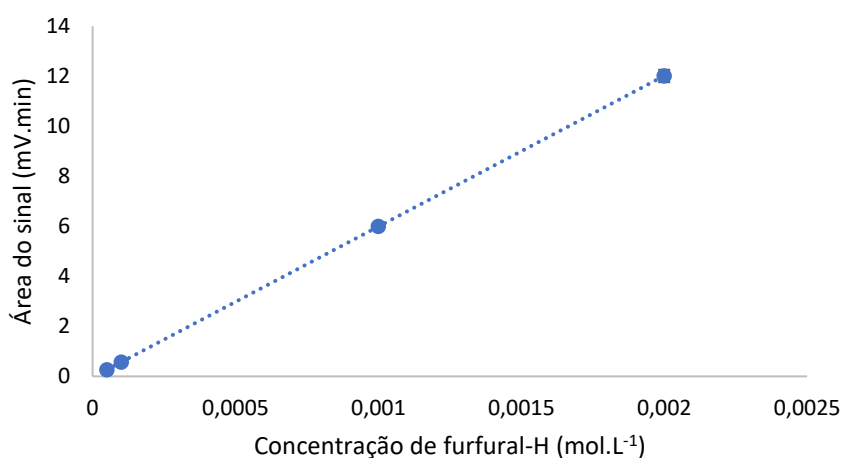


Figura 18 – Área do sinal cromatográfico de furfural-H, após extração por 15 minutos, em função da concentração da solução modelo ensaiada.

Tabela 12 - Parâmetros analíticos da curva de calibração nos ensaios de recuperação com soluções modelo

Declive	6024,0 ± 12,7 mV.min.mol ⁻¹ .L
Ordenada na origem	-0,034 ± 0,010 mV.min
Coefficiente de correlação	1,00

Foi possível estabelecer uma correlação linear entre o sinal cromatográfico de furfural-H e a concentração de solução modelo ensaiada, para o tempo de extração selecionado, o que ilustra a aplicabilidade da estratégia seguida até este momento para fins quantitativos. A etapa seguinte deste estudo teve por objetivo caracterizar o sistema de extração assistido por ventilador em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

3.1.4. Repetibilidade e precisão intermédia do sistema de extração assistida por ventilador com soluções modelo

Para a caracterização do sistema de extração assistida por ventilador quanto à repetibilidade, realizaram-se ensaios de recuperação, em triplicado, de soluções modelo de furfural de concentração $5,00 \times 10^{-5}$ e $2,00 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, durante 15 minutos tal como definido no ponto anterior. Os extratos foram analisados no sistema HPLC-UV/Vis. Observando o sinal cromatográfico e calculando o desvio padrão intradia, obtiveram-se valores inferiores a 3,7%.

Para a caracterização do sistema de extração assistida por ventilador quanto à precisão intermédia, realizaram-se ensaios de recuperação, em triplicado, de uma solução modelo de furfural de concentração $2,00 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, durante 15 minutos, em 3 dias diferentes. Os extratos foram analisados no sistema HPLC-UV/Vis. Observando o sinal cromatográfico e calculando o desvio padrão entre dias, obteve-se um valor de 4,5%.

Com base nestes resultados considerou-se, assim, que o sistema apresentou baixos valores de desvio padrão para a repetibilidade e precisão intermédia no diz respeito à recuperação do furfural. Estando o sistema de extração assistida por ventilador devidamente caracterizado a nível de perfil de recuperação bem como de repetibilidade e precisão intermédia recorrendo a soluções modelo, o passo seguinte passará pela caracterização do sistema utilizando amostras de malte.

3.2. Ensaio com maltes

3.2.1. Seleção de um padrão interno

De modo a compensar variações de volume injetado da solução aceitadora pelo amostrador automático do sistema HPLC, procedeu-se à seleção de um padrão interno nesta solução. Foi ensaiado o composto 2-nonanona; este composto é igualmente um composto carbonílico e passível, portanto, de sofrer derivatização por reação com o reagente de derivatização 2,4-DNPH. Adicionalmente foi já descrita a eluição da respetiva hidrazona em condições de eluição similares às utilizadas neste trabalho [49]. Um padrão interno deve cumprir os seguintes requisitos: não estar presente na amostra, ter um sinal bem resolvido em relação aos restantes sinais da amostra e ser estruturalmente semelhante ao analito. Assim, preparou-se uma solução de 2-nonanona-H de concentração $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, pipetando $1 \mu\text{L}$ de solução padrão mãe de 2-nonanona para $999 \mu\text{L}$ de solução aceitadora de 2,4-DNPH, sendo a mesma em seguida injetada no sistema HPLC-UV/Vis e analisada segundo o método de eluição descrito em 2.4. Na figura 19 apresenta-se a sobreposição dos cromatogramas da solução modelo de 2-nonanona-H e de um extrato de 1 g de malte *black* moído.

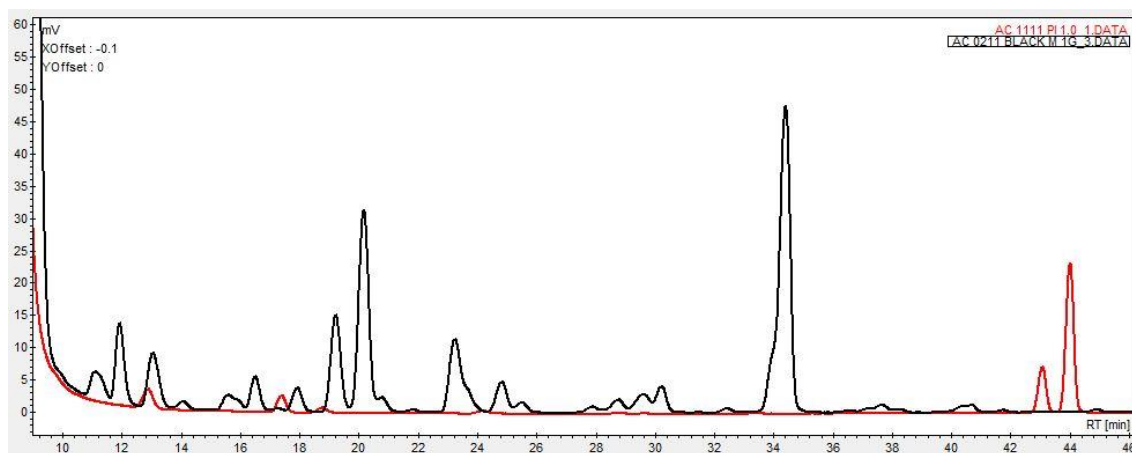


Figura 19 - Sobreposição dos cromatogramas solução modelo 2-nonanona-H $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (—) e extrato de malte black (—).

As hidrazonas do composto 2-nonanona apresentaram, respetivamente, dois sinais cromatográficos aos tempos de retenção de 43,01 e 44,01 minutos (isómero *cis* e *trans*, respetivamente). Pelos resultados obtidos verifica-se que este composto obedece aos principais requisitos anteriormente referidos para poder ser usado como padrão interno, nomeadamente, nas condições ensaiadas não coeluiu com nenhum composto presente nesta matriz, e não há evidência de que altere significativamente os

equilíbrios na solução aceitadora entre o reagente derivatizante 2,4-DNPH e os demais compostos carbonílicos presentes. Cumpridos estes requisitos, a 2-nonanona será utilizada como padrão interno na metodologia de extração. Daqui em diante, o sinal de furfural será considerado como a razão entre a área do sinal cromatográfico do furfural-H e a área do sinal cromatográfico de 2-nonanona-H, designada como $\frac{A_{SF}}{A_{S2N}}$.

3.2.2. Identificação do sinal cromatográfico de furfural-H em amostras de malte

Para a identificação do sinal cromatográfico de furfural-H em amostras de malte, submeteram-se 10 g de maltes *pale*, *black*, *brown* e *chocolate* à metodologia de extração descrita em 2.3.3, à temperatura ambiente, e analisaram-se os extratos por HPLC-UV/Vis de acordo com as condições de eluição referidas em 2.4. De referir que, as condições experimentais adotadas de massa de malte e de eluição cromatográfica, são idênticas às referidas em trabalhos anteriores deste grupo de investigação, em que se estudou a extração da fração carbonílica em maltes num sistema de extração assistida a baixa pressão [50]. Na figura 20 apresenta-se a sobreposição dos cromatogramas correspondentes aos extratos do malte *black*, *chocolate*, *brown* e igualmente de uma solução modelo de furfural-H de concentração $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

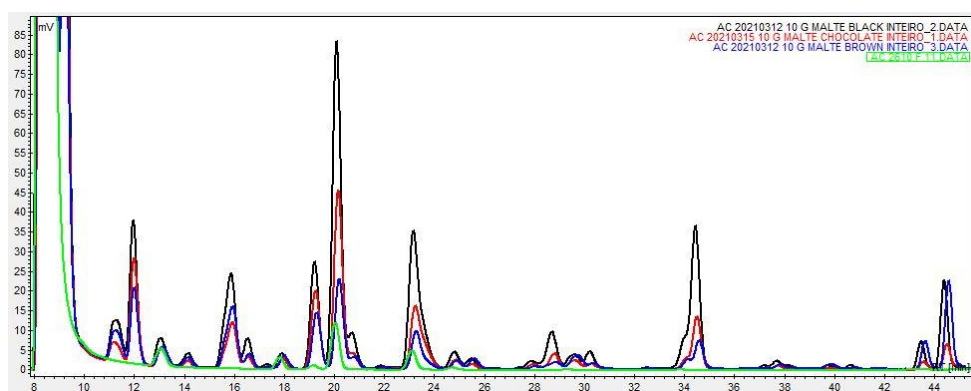


Figura 20 - Identificação do sinal cromatográfico de furfural ($t_R = 20,1 \text{ min}$) em amostras de malte *black* (—), *chocolate* (—), *brown* (—) e solução modelo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (—).

Nas condições agora ensaiadas, observou-se um perfil cromatográfico similar ao anteriormente descrito utilizando um sistema de extração assistida a baixa pressão [50]. Ao tempo de retenção do furfural-H foi observado um sinal cromatográfico para todas as amostras ensaiadas. O furfural-H não coeluiu com outros compostos, tendo isto sido

confirmado recorrendo à análise dos mesmos extratos num sistema HPLC-DAD-MS/MS. Por análise dos espectros de massa obtidos verificou-se que ao tempo de retenção do furfural, observaram-se apenas os iões correspondentes a este composto: 275 (MS) e 228 e 163 (MS²). Estes resultados sugerem que a metodologia de extração proposta e o método de eluição adotado permitem obter um sinal cromatográfico de elevada seletividade para o furfural nestas matrizes. Observou-se igualmente que a intensidade de sinal foi maior nos maltes *black* e *chocolate* (maltes intensamente torrados), e menos intenso para o malte *brown*. Tal como foi anteriormente referido, o furfural é um composto cuja formação está associada a alimentos processados a temperaturas alta e como tal, é expectável que esteja presente em maior quantidade quanto mais torrada for a amostra de malte.

Comparando os resultados agora discutidos com os resultados obtidos num sistema de extração assistida a baixa pressão [50], com o mesmo equipamento e nas mesmas condições experimentais, verificou-se uma maior intensidade de sinal cromatográfico de furfural-H, e do perfil carbonílico volátil em geral, na amostra de malte *black* quando se utiliza o sistema de extração assistida por ventilador. Esta observação sugere que a extração dos compostos voláteis é mais eficiente no sistema aqui proposto.

Estando o sinal cromatográfico de furfural-H identificado nas amostras de malte, o estudo seguinte pretendeu avaliar o impacto da moagem do malte nos sinais cromatográficos obtidos.

3.2.3. Avaliação da intensidade do sinal cromatográfico em malte moído vs inteiro

De modo a avaliar se a moagem do malte proporciona diferenças significativas no perfil cromatográfico, submeteram-se amostras de 10 g e 1 g de malte *black* inteiro e moído, respetivamente, à metodologia de extração, em triplicado, segundo o procedimento experimental descrito em 2.3.3, à temperatura ambiente. A escolha de 1 g de amostra moída prende-se com o facto de este valor de massa ser suficiente para cobrir a base do frasco do sistema de extração assistida por ventilador. Os extratos obtidos foram analisados no sistema HPLC-UV/Vis segundo o método de eluição descrito em 2.4. Na figura 21 apresenta-se a sobreposição dos cromatogramas obtidos.

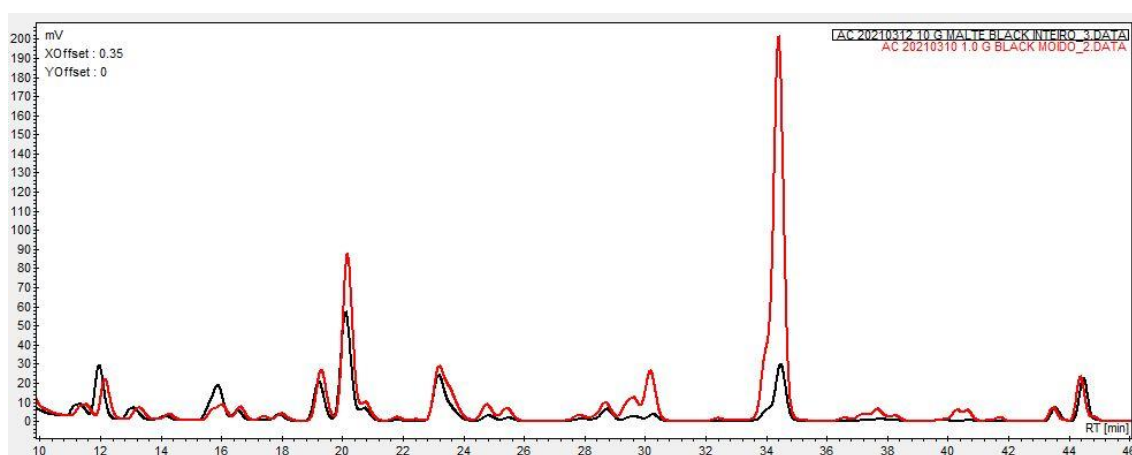


Figura 21 - Sobreposição dos cromatogramas de 10 g de malte *black* inteiro (—) e 1 g de malte *black* moído (—).

O perfil cromatográfico obtido para a amostra de malte moída revelou sinais cromatográficos mais intensos, o que permite concluir que nestas condições a extração é mais eficiente. Efetivamente, essa diferença foi patente mesmo considerando as diferentes massas ensaiadas (10 g malte não moído vs 1 g malte moído). A maior sensibilidade observada para a amostra moída era expectável atendendo à maior área de superfície que nestas condições fica exposta, comparativamente à utilização de amostras de malte em grão.

Em virtude dos resultados obtidos, decidiu-se proceder à moagem do malte para os ensaios seguintes envolvendo esta matriz.

3.2.4. Avaliação da proporcionalidade do sinal cromatográfico de furfural-H com a massa de amostra

Tendo em vista a realização de um estudo da proporcionalidade do sinal cromatográfico de furfural-H com a massa de amostra, ensaiaram-se diferentes massas de malte *black* moído de acordo com procedimento de extração descrito em 2.3.3, à temperatura ambiente. Os extratos foram analisados por HPLC-UV/Vis segundo o método de eluição descrito no ponto 2.4.

Verificou-se uma falta de proporcionalidade de sinal com a massa de amostra, bem como uma falta de repetibilidade entre réplicas de extratos obtidos para o mesmo valor de massa ensaiada. Em virtude deste problema, foram realizados vários estudos

de forma pontual e não exaustiva. Explorou-se a possibilidade deste comportamento estar relacionado com: i) captação de humidade pela amostra dentro do sistema de extração, tendo-se realizado extrações em que à massa de amostra se misturava um agente exsiccante Na_2SO_4 ; ii) um impedimento à superfície da solução aceitadora de 2,4-DNPH, tendo-se procedido à agitação desta solução com recurso a uma barra magnética durante a extração; iii) a presença de eletricidade estática no sistema de extração, tendo-se realizado extrações com o mesmo ligado à terra. Para todas as condições experimentais ensaiadas, não foi possível obter resultados repetíveis e proporcionais com a massa, independentemente de se terem igualmente ensaiado massas mais reduzidas, malte não moído, bem como diferentes tipos de malte. Uma possível justificação para estes resultados poderá ser a absorção, pela amostra, de acetonitrilo e água provenientes de uma eventual evaporação da solução aceitadora durante o processo de extração, efeito esse que poderia influenciar a libertação dos compostos voláteis da amostra.

Decidiu-se, por fim, testar a influência de aquecimento da amostra durante a extração, com o objetivo de minimizar o efeito de absorção de acetonitrilo pela amostra.

3.2.5. Caracterização da extração do furfural no tempo e com aquecimento

De modo a caracterizar a extração do furfural em função do tempo e temperatura, realizou-se a extração de compostos voláteis em amostras de 0,25 g de maltes *black*, *chocolate*, *brown* e *pale* moídos, durante 4 horas, sendo a solução aceitadora de 2,4-DNPH substituída por igual volume ao fim de 5, 15, 30, 60, 120 minutos. Com este estudo pretendeu-se igualmente avaliar a possibilidade de extração total dos compostos voláteis e, nesse caso, aumentar a repetibilidade do processo de extração. O estudo foi realizado a três temperaturas: 20, 30 e 40 °C. Na figura 22 apresentam-se os gráficos representativos deste estudo, no qual se representam os valores $\frac{A_{SF}}{A_{S2N}}$ cumulativos ao longo do tempo.

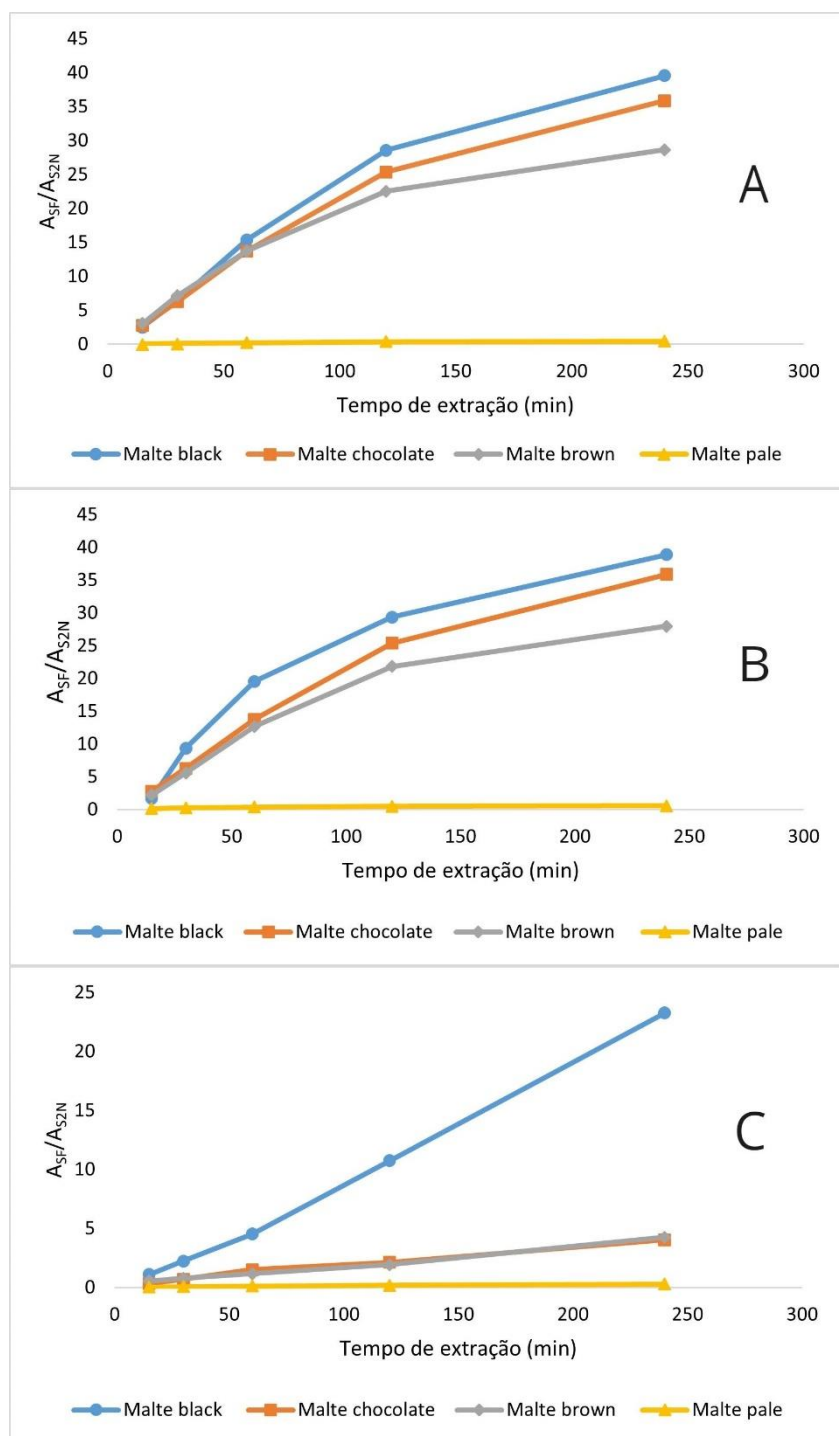


Figura 22 - Estudo da extração do furfural ao longo do tempo sob diferentes temperaturas. A – 20 °C; B – 30 °C; C – 40 °C.

Segundo os resultados obtidos para as três temperaturas ensaiadas, a extração de furfural é contínua durante as 4 horas, não tendo sido possível extrair totalmente este composto no intervalo de tempo ensaiado. O malte *pale* surge como uma exceção a esta observação visto que o sinal de furfural é muito reduzido, ficando assim mais difícil observar esta tendência. Adicionalmente, verificou-se uma perda de intensidade de sinal

cromatográfico de furfural-H com o aumento da temperatura, sendo esta diferença especialmente marcada no ensaio realizado a 40 °C.

Uma observação adicional, e igualmente prevista, foi o facto de os maltes *black*, *chocolate* e *brown* terem apresentado nesta ordem, menores valores de furfural. Tal deve-se às diferentes intensidades de torra a que estes maltes estão sujeitos, o que tem implicações diretas sobre o teor de furfural conforme foi anteriormente referido.

Por fim, foi ensaiado em duplicado as massas 0,05, 0,15 e 0,25 g de malte *black* moído, a diferentes temperaturas, nomeadamente, 20, 30, 40 e 50 °C, durante 15 minutos, segundo o procedimento experimental descrito em 2.3.3 para caracterizar a proporcionalidade do sinal cromatográfico de furfural-H em função da massa e da temperatura. Na figura 23 apresenta-se o gráfico obtido que correlaciona $\frac{A_{SF}}{A_{S2N}}$ com a massa de malte nestas condições.

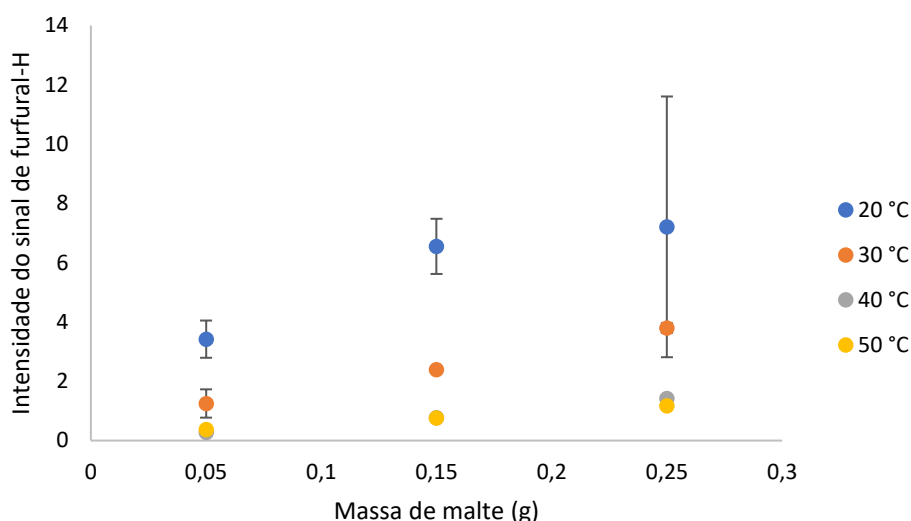


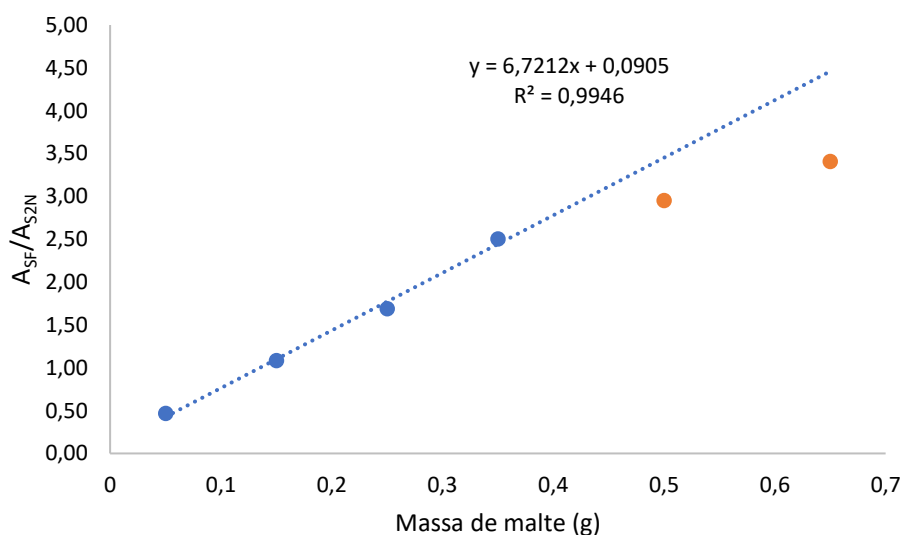
Figura 23 – A_{SF}/A_{S2N} em função da massa de malte às diferentes temperaturas ensaiadas.

Segundo os resultados obtidos, verificou-se uma redução na intensidade do sinal cromatográfico de furfural-H com o aumento da temperatura, existindo uma perda de sensibilidade, tal como já tinha sido evidenciado no ensaio anterior. Contudo, esta redução na intensidade do sinal com o aumento da temperatura foi acompanhada por uma maior repetibilidade entre réplicas (tabela 13) bem como de uma proporcionalidade do sinal obtido com a massa ensaiada. Assim, os resultados foram mais satisfatórios às temperaturas de 40 e 50 °C. Como tal, seleccionou-se para os ensaios seguintes a temperatura de 40 °C.

Tabela 13 - Valores de RSD (%) associados aos ensaios com aquecimento

20 °C			30 °C			40 °C			50 °C		
0,05 g	0,15 g	0,25 g	0,05 g	0,15 g	0,25 g	0,05 g	0,15 g	0,25 g	0,05 g	0,15 g	0,25 g
18%	14%	61%	38%	2%	4%	13%	9%	2%	11%	2%	1%

O passo seguinte passou pelo estudo mais extensivo da proporcionalidade do sinal cromatográfico de furfural-H em função da massa de malte. Para tal, ensaiaram-se as massas de 0,05, 0,15, 0,25, 0,35, 0,50 e 0,65 g de malte *black* moído de acordo com as condições de extração até aqui adotadas. Na figura 24 apresenta-se o gráfico obtido que correlaciona $\frac{A_{SF}}{A_{S2N}}$ com a massa de malte *black* ensaiada.

**Figura 24** - A_{SF}/A_{S2N} em função da massa de malte *black* ensaiada.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se um aumento proporcional do sinal cromatográfico em função da massa de malte *black* ensaiada no intervalo compreendido entre 0,05 e 0,35 g. Os pontos correspondentes às massas de 0,50 e 0,65 g representam um desvio a esta tendência, o que poderá ser explicado pelo reduzido tempo de extração a que as amostras foram sujeitas. Considerando apenas os primeiros quatro pontos obtém-se uma linearidade bastante satisfatória, de resto comprovada pelo valor de coeficiente de determinação (0,9946). Deste modo, selecionou-se 0,25 g como o valor de massa de malte a utilizar nos ensaios seguintes.

Estando a extração do furfural devidamente caracterizada, o estudo seguinte passou pela avaliação da repetibilidade e precisão intermédia do sistema de extração assistido por ventilador em amostras de malte.

3.2.6. Repetibilidade e precisão intermédia do sistema de extração assistida por ventilador com amostras de malte

De modo a avaliar a repetibilidade do sistema, realizou-se a extração, em triplicado, de 0,25 g de malte *black* moído, de acordo com o procedimento experimental descrito em 2.3.3, à temperatura de 40 °C. Para avaliar a precisão intermédia do sistema, submeteu-se à extração 0,25 g de malte *black*, em duplicado, em 3 dias diferentes, de acordo com o mesmo procedimento experimental. Na tabela 14 apresentam-se os valores de desvio padrão relativo intradia e entre dias correspondentes a estes conjuntos de ensaios.

Tabela 14 - Valores de RSD (%) correspondentes aos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia

Repetibilidade	Precisão intermédia
RSD (%) intradia	RSD (%) entre dias
1,8% (n=3)	2,8% (n=3)

Por um lado, calculou-se o desvio padrão relativo intradia o conjunto de réplicas extração de malte *black*, tendo-se obtido um valor de 1,8%. Por outro lado, calculou-se o desvio padrão relativo entre dias para a extração de malte *black* em três dias diferentes, tendo-se obtido um valor de 2,8%. Com base nestes resultados considerou-se, assim, que o sistema apresentou baixos valores de desvio padrão para a repetibilidade e precisão intermédia no que diz respeito à extração do furfural nesta matriz.

Estando o sistema assistido por ventilador devidamente caracterizado a nível de repetibilidade e precisão intermédia em amostras de malte, o passo seguinte teve por objetivo a identificação de compostos furânicos adicionais nesta matriz.

3.2.7. Identificação de compostos furânicos em amostras de malte por HPLC-DAD-MS/MS

Os principais compostos furânicos descritos na literatura passíveis de ocorrerem em amostras de malte são, além do furfural, o 5-MF e o 5-HMF [39],[44]. De modo a proceder à identificação de compostos furânicos em amostras de malte, submeteram-se 0,25 g de malte moído dos tipos *black*, *brown*, *chocolate* e *pale*, ao procedimento de extração descrito em 2.3.3, à temperatura de 40 °C. Os extratos foram injetados no sistema HPLC-DAD-MS/MS e analisados segundo as condições cromatográficas e parâmetros de espectrometria de massa descritos no ponto 2.4. Na análise aos espectros de massa foi feita uma avaliação quanto à presença do íão base relativamente a esses compostos, nomeadamente, m/z 289 para o 5-MF e m/z 305 para o 5-HMF. Na figura 25 apresenta-se a sobreposição dos cromatogramas correspondentes aos extratos dos maltes *black*, *brown*, *chocolate* e *pale*.

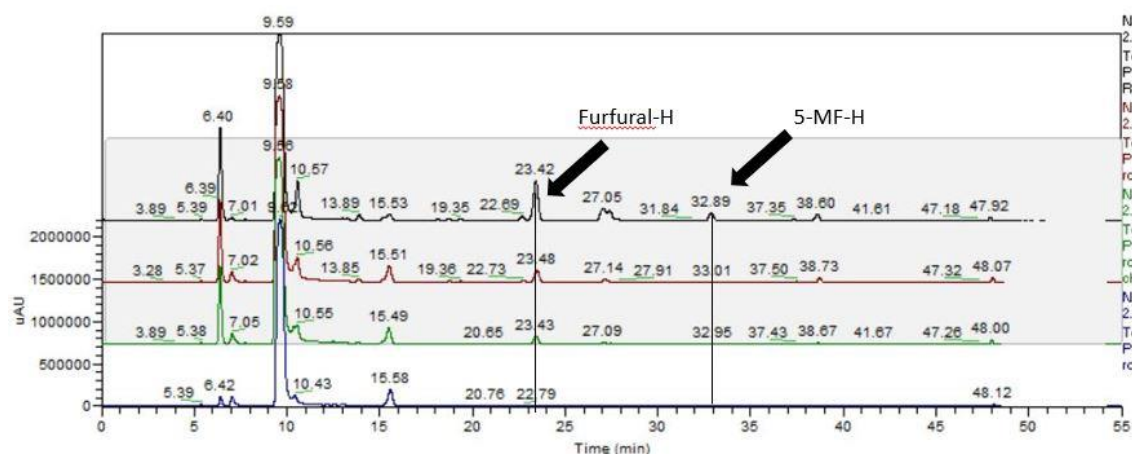


Figura 25 – Identificação do sinal cromatográfico de furfural-H ($t_R = 23,4$ min) e 5-MF-H ($t_R = 32,9$ min) em amostras de malte *black* (—), *chocolate* (—), *brown* (—) e *pale* (—).

Nestes ensaios foi possível identificar ao tempo de retenção 32,9 min o sinal cromatográfico de 5-MF-H nas amostras de maltes torrados. Tendo em conta que o sinal de 5-MF-H, nos maltes *chocolate* e *brown*, é pouco intenso, apenas foi possível detetar o íão base.

Não foi possível detetar nestas amostras qualquer sinal cromatográfico relativo ao 5-HMF. Efetivamente, estudos preliminares de recuperação com soluções modelo

deste aldeído, evidenciaram a impossibilidade de extrair este composto (resultados não apresentados). Uma possível justificação para estes resultados é a baixa volatilidade comparativamente aos outros compostos furânicos identificados. À temperatura de 25 °C, o 5-HMF e o furfural são caracterizados por um valor de pressão de vapor igual a $5,28 \times 10^{-3}$ e 2,21 mm Hg, respetivamente [51],[52].

Tendo-se detetado, em maltes torrados, um composto furânico adicional, o passo seguinte passou pela identificação do sinal cromatográfico de 5-MF em soluções modelo.

3.2.8. Identificação do sinal cromatográfico de 5-metilfurfural num sistema HPLC-UV/Vis

Para a identificação do sinal cromatográfico de 5-MF-H num sistema HPLC-UV/Vis preparam-se 3 soluções modelo de furfural-H de concentrações $1,14 \times 10^{-4}$, $2,28 \times 10^{-4}$ e $3,42 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de acordo com o procedimento experimental descrito no ponto 2.1.1. Estas soluções modelo foram injetadas no sistema HPLC-UV/Vis, e analisadas de acordo com o método de eluição anteriormente descrito (2.4). Na figura 26 apresenta-se a sobreposição dos cromatogramas correspondentes às soluções modelo.

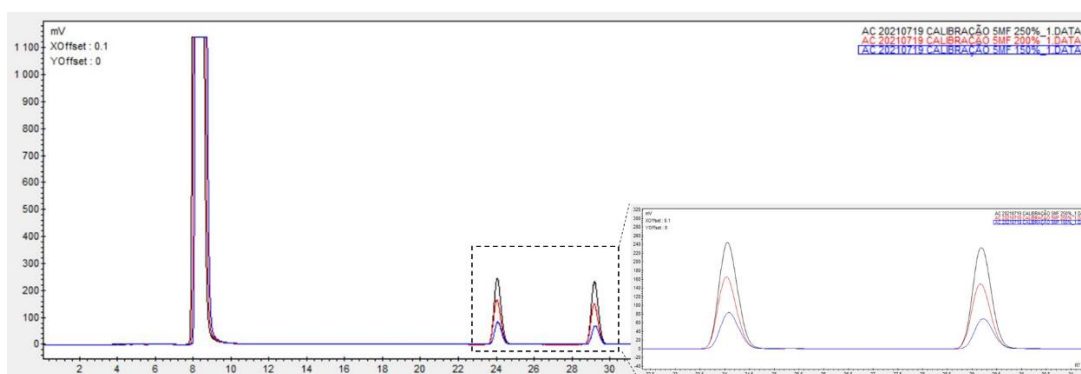


Figura 26 - Identificação dos sinais cromatográficos do 5-MF-H ($t_R = 23,8$ min e $t_R = 29,1$)

Como era expectável, o 5-MF-H dá origem a dois sinais cromatográficos correspondentes aos isómeros cis e trans. Tendo em conta que o sinal ao tempo de retenção 23,8 minutos apresenta uma coeluição parcial com o isómero cis do furfural-H

(ponto 3.1.1), considerar-se-á o sinal ao tempo de retenção de 29,1 minutos como o sinal cromatográfico de 5-MF-H nos restantes ensaios.

3.2.9. Curva de calibração de 5-metilfurfural-H em soluções modelo

Para a caracterização, quanto à linearidade, do sinal cromatográfico de 5-MF-H num sistema de HPLC-UV/Vis, prepararam-se diferentes soluções deste composto num intervalo de concentrações compreendido entre $5,70 \times 10^{-5}$ e $4,56 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de acordo com o procedimento experimental descrito no ponto 2.1.1. As soluções modelo preparadas em duplicado foram injetadas no HPLC e analisadas de acordo com o método de eluição descrito em 2.4. Na tabela 15 apresentam-se os dados obtidos para o conjunto de soluções modelo preparadas. Na figura 27 apresenta-se a curva de calibração obtida para soluções modelo de 5-MF-H.

Tabela 15 - Valores de área e tempo de retenção para soluções modelo de 5-MF-H analisados por HPLC-UV/Vis

[5-metilfurfural] / mol.L ⁻¹	Área / mV.min	Tempo de retenção / min
$5,70 \times 10^{-5}$	15,59	29,05
$1,14 \times 10^{-4}$	32,11	29,06
$2,28 \times 10^{-4}$	67,72	29,08
$3,42 \times 10^{-4}$	105,66	29,13
$4,56 \times 10^{-4}$	145,04	29,11

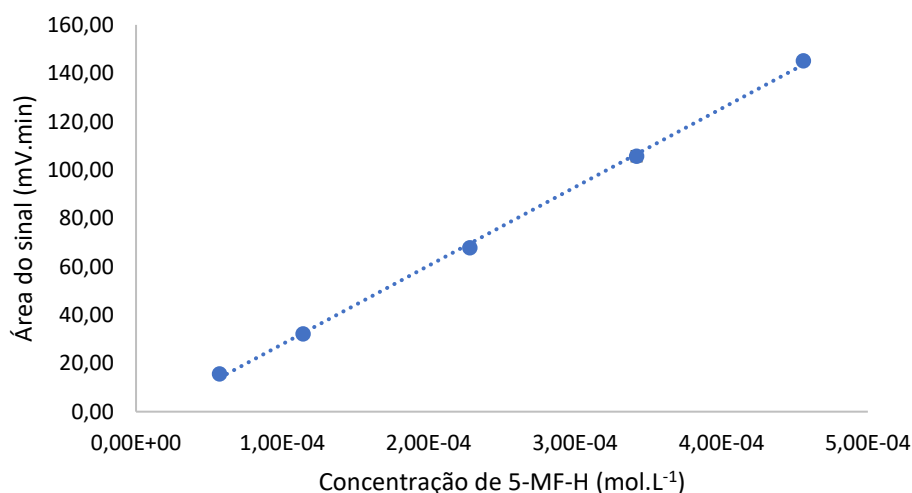


Figura 27 - Curva de calibração típica para soluções modelo de 5-MF-H.

A partir dos resultados obtidos calcularam-se os parâmetros analíticos da curva de calibração, de acordo com o descrito por Miller e Miller [48] (tabela 16).

Tabela 16 - Parâmetros analíticos da curva de calibração do 5-MF-H.

Declive	$3,25 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^4 \text{ mV.min.mol}^{-1}.\text{L}$
Ordenada na origem	$-4,54 \pm 4,7 \text{ mV.min}$
Coeficiente de correlação	0,9996

De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que existe linearidade entre a intensidade do sinal medido e a concentração (de resto suportada pelo valor do coeficiente de correlação), bem como repetibilidade relativamente ao tempo de retenção de 5-MF. Estando o sinal cromatográfico de 5-MF caracterizado, estes resultados permitiram avançar com a sua quantificação, bem como de furfural, nas amostras de malte.

3.2.10. Ensaio preliminares para a quantificação de furfural e 5-metilfurfural em amostras de malte pelo método da adição de padrão

De modo a investigar um possível efeito de matriz associado à extração furfural e 5-MF nas amostras de malte *black*, *chocolate*, *brown* e *pale*, recorreu-se ao método da adição de padrão (MAP), de acordo com o procedimento experimental descrito em 2.3.4, sendo os extratos analisados por HPLC-UV/Vis de acordo com o método de eluição descrito no ponto 2.4. O MAP é um método para a determinação quantitativa de um analito quando existe um efeito de matriz associado à análise. Resumidamente, o MAP consiste na preparação de amostras sobre as quais é realizada a adição de quantidades bem definidas de analito à amostra. Posteriormente, cada amostra é analisada e o valor da propriedade medida é, por fim, representado graficamente. A determinação da concentração do analito é realizada por extrapolação gráfica. Na figura 28 apresentam-se as curvas de calibração do MAP obtidas pela adição de furfural e 5-MF, respetivamente, nas diferentes matrizes.

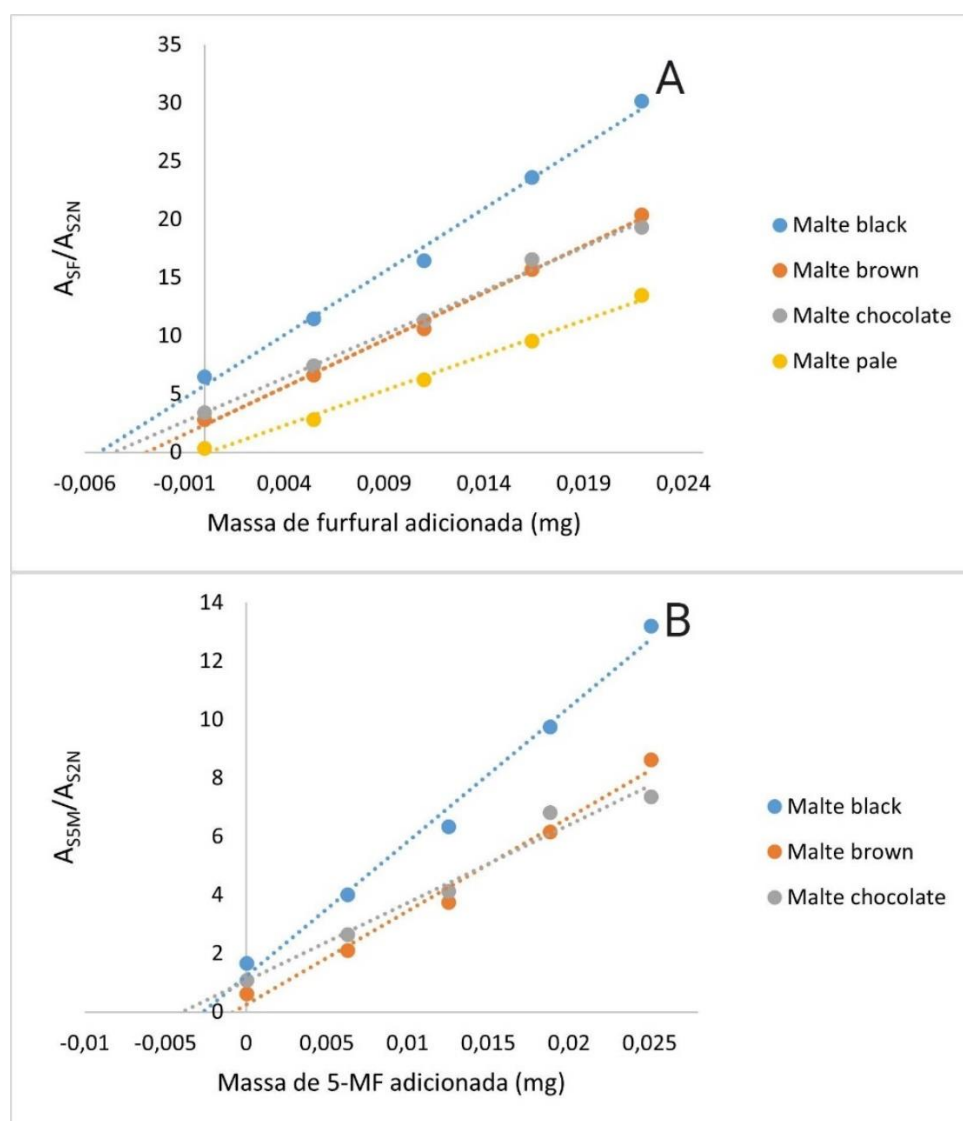


Figura 28 - Curvas de calibração associadas ao MAP para o furfural (A) e 5-MF (B).

A partir das curvas de calibração, determinaram-se os parâmetros analíticos presentes na tabela 17, de acordo com o descrito por Miller e Miller [48].

Tabela 17 - Parâmetros analíticos das curvas de calibração associadas ao MAP

		Declive / mg^{-1}	Ordenada na origem	Coefficiente de correlação linear
Malte black	furfural	1086 ± 170	$5,7 \pm 2,3$	0,9964
	5-MF	$459,4 \pm 82,7$	$1,2 \pm 1,3$	0,9952
Malte chocolate	furfural	748 ± 112	$3,4 \pm 1,5$	0,9967
	5-MF	267 ± 82	$1,1 \pm 1,3$	0,9862
Malte brown	furfural	$809,6 \pm 92,3$	$2,4 \pm 1,2$	0,9981
	5-MF	$320,4 \pm 67,7$	$0,2 \pm 1,0$	0,9935
Malte pale	furfural	$603,7 \pm 84,3$	$0,1 \pm 1,1$	0,9971

Determinou-se também as recuperações de furfural e 5-MF associadas ao MAP, estando as mesmas descritas na tabela 18.

Tabela 18 - Recuperações de furfural e 5-MF associadas ao MAP

Tipo de malte	Recuperação furfural	Recuperação 5-MF
Black	45 - 53%	42 - 47%
Chocolate	35 - 45%	31 - 40%
Brown	37 - 42%	34 - 39%
Pale	21 - 27%	-

Em face dos resultados obtidos observou-se que os declives das curvas de calibração associadas ao MAP diferem dos declives das curvas de calibração em soluções modelo. Observou-se igualmente que as curvas de calibração associadas ao MAP apresentam, também, declives diferentes entre si para cada amostra. Finalmente, pelo MAP obtiveram-se valores de recuperação de furfural marcadamente mais reduzidos do que os valores obtidos nos estudos realizados com soluções modelo (ponto 3.1.3). Este comportamento sustenta a necessidade do uso do MAP para a quantificação dos analitos nestas matrizes. Por fim, calculou-se o teor de furfural e 5-MF, expresso em mg.g^{-1} , corrigido com o valor de teor de humidade (tabela 19).

Tabela 19 - Teores de furfural e 5-MF corrigidos com o valor de teor de humidade

Tipo de malte	Teor de humidade	Teor furfural / mg.g^{-1}	Teor 5-MF / mg.g^{-1}
Malte black	4,6%	$2,21 \times 10^{-2} \pm 1,2 \times 10^{-2}$	$1,12 \times 10^{-2} \pm 1,3 \times 10^{-2}$
Malte chocolate	5,1%	$1,92 \times 10^{-2} \pm 1,1 \times 10^{-2}$	$1,67 \times 10^{-2} \pm 2,4 \times 10^{-2}$
Malte brown	5,2%	$1,23 \times 10^{-2} \pm 7,6 \times 10^{-3}$	$3,05 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-2}$
Malte pale	6,6%	$9,59 \times 10^{-4} \pm 7,9 \times 10^{-3}$	-

Os teores de furfural e 5-MF obtidos encontram-se na mesma ordem de grandeza que os teores descritos na literatura [39]. Verificou-se, também, uma correlação entre as condições da torra e o teor de furfural: quanto mais torrado o malte, maior o seu teor. O 5-MF segue, também esta tendência, com a exceção de que se verificou um maior teor na amostra de malte *chocolate*, comparativamente com a amostra de malte *black*.

De modo a estudar o efeito do tempo de incorporação de furfural e 5-MF aquando da adição de padrão sobre a amostra, realizou-se um ensaio exploratório em que, sobre a amostra de malte *black*, realizou-se a adição de 5 μL da solução *mix* de concentração $4,56 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ (ponto 2.1.1) e comparou-se a intensidade de sinal associada após dois tempos de incorporação: 12 e 60 horas. O sinal de furfural-H obtido ao fim de 12 horas de incorporação foi de 30,15, enquanto o sinal de furfural-H ao fim de 60 horas de incorporação foi de 19,47, correspondendo a uma perda de 35%. Adicionalmente, o sinal de 5-MF-H obtido ao fim de 12 horas de incorporação foi de 13,19, enquanto o sinal de 5-MF-H obtido ao fim de 60 horas de incorporação foi de 7,01, correspondendo a uma perda de 47%. Tendo em conta que em ambas as situações o procedimento experimental e condições de ensaio foram iguais, estes resultados sugerem, uma vez mais, o efeito de matriz anteriormente referido.

Estes resultados sugerem a necessidade da realização de um estudo mais profundo com vista a aumentar o ritmo de análise, i.e. acelerar o processo de estabilização da amostra após a adição de padrão. Outro estudo possível será estudar a possibilidade de se obter uma calibração para cada tipo de malte, evitando assim a necessidade de realizar o MAP para cada amostra.

4. Conclusão

O sistema de extração assistida por ventilador revelou-se eficaz para a extração de compostos furânicos, nomeadamente o furfural e o 5-metilfurfural, de amostras de malte. A separação e identificação dos compostos furânicos foi realizada com recurso a HPLC-UV/Vis e/ou HPLC-DAD-MS/MS.

Os ensaios preliminares com soluções modelo de furfural-H permitiram caracterizar o seu sinal cromatográfico como sendo proporcional à sua concentração e repetível a nível de tempo de retenção. Adicionalmente, estudou-se o perfil de recuperação de furfural no sistema de extração assistida por ventilador, tendo-se obtido recuperações superiores a 75% nos tempos de extração ensaiados. Selecionou-se 15 minutos como tempo de extração a utilizar nos estudos seguintes. Finalmente, o sistema de extração assistida por ventilador apresentou baixos valores de desvio padrão para a repetibilidade e precisão intermédia com soluções modelo de furfural, tendo-se obtido valores de precisão intradia e entre dias de 3,7% e 4,5%, respetivamente.

No âmbito do estabelecimento de um padrão interno da extração, selecionou-se a 2-nonanona por respeitar os principais requisitos de um padrão interno.

Identificou-se o sinal de furfural-H em extratos de maltes *black*, *chocolate*, *brown* e *pale*. Observou-se que a intensidade de sinal cromatográfico foi maior nos maltes mais intensamente torrados. Observou-se, também, uma maior intensidade de sinal cromatográfico de furfural-H e do perfil carbonílico em geral utilizando o sistema de extração assistida por ventilador, comparativamente com um sistema de extração assistida a baixa pressão.

Avaliou-se o efeito da moagem da amostra no perfil cromatográfico, tendo-se verificado que uma etapa prévia de moagem do malte proporcionou sinais cromatográficos mais intensos. Como tal, decidiu-se proceder à moagem prévia do malte nos estudos seguintes.

Realizou-se um estudo da caracterização da extração de furfural no tempo e com aquecimento, tendo-se constatado que não foi possível extrair totalmente este analito no intervalo de tempo ensaiado. Constatou-se, igualmente, uma perda de intensidade de sinal cromatográfico de furfural-H com a temperatura. Após a extração de malte *black* a 4 temperaturas diferentes, selecionou-se 40 °C como temperatura de extração. Fazendo um estudo da proporcionalidade de sinal de furfural-H em função da massa de malte à temperatura selecionada, foi possível obter uma correlação linear. Selecionou-

se 0,25 como massa de malte a utilizar nos ensaios seguintes. O sistema de extração assistida por ventilador apresentou baixos valores de desvio padrão para a repetibilidade e precisão intermédia com amostras de malte *black*, tendo-se obtido valores de precisão intradia e entre dias de 1,8% e 2,8%, respetivamente.

Com recurso a HPLC-DAD-MS/MS foi possível identificar o furfural e 5-metilfurfural nas amostras de malte. Tendo-se caracterizado o sinal cromatográfico de 5-metilfurfural-H, este revelou-se proporcional à concentração e repetível em relação ao tempo de retenção.

Realizaram-se ensaios preliminares para a quantificação de furfural e 5-metilfurfural nas amostras de malte através do método da adição de padrão. As recuperações destes analitos bem como os parâmetros analíticos das curvas de calibração sugeriram um efeito de matriz associado ao malte. Os teores de furfural e 5-metilfurfural encontram-se de acordo com o descrito na literatura. Adicionalmente, verificou-se um efeito do tempo de incorporação dos analitos na matriz, que se traduziu numa diminuição de sinal cromatográfico com um tempo de incorporação maior. Assim, existe uma necessidade de realizar um estudo mais extenso de otimização da incorporação dos analitos nesta matriz. Por fim, poderá ser estudada a possibilidade de se obter uma calibração para cada tipo de malte, evitando assim a necessidade de realizar o MAP para cada amostra.

Referências bibliográficas

- [1] R. H. Michel, P. E. McGovern, and V. R. Badler, “Chemical evidence for ancient beer” *Nature*, vol. 360, no. 6399, p. 24, 1992, doi: 10.1038/360024b0.
- [2] S. Verberg, “From Herbal To Hopped Beer : the Displacement of Regional Herbal Beer Traditions By Commercial Export Brewing in Medieval Europe” December, pp. 9–23, 2020.
- [3] I. S. Horney, *A history of beer and brewing*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003.
- [4] K. B. U. Report, “Global Beer Consumption by Country in 2019.”
- [5] D. E. Briggs, C. A. Boulton, P. A. Brookes, and R. Stevens, *Brewing - Science and practice*. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited, 2004.
- [6] Statista, “World barley production from 2008/2009 to 2020/2021.” <https://www.statista.com/statistics/271973/world-barley-production-since-2008/> (Consultado a 15 de julho de 2021).
- [7] M. Zhou, “Chapter 1: Barley production and consumption” *Springer Sci.*, July 2010, doi: 10.1007/978-3-642-01279-2.
- [8] Montana State University, “2-Row vs 6-Row.” <https://www.montana.edu/barleybreeding/learning-center/maltster-resources/articles-posters/2r-v-6r.html> (Consultado a 5 de julho de 2021).
- [9] I. S. Hornsey, *Brewing*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999.
- [10] C. Wrigley, C. E. Walker, and H. Corke, *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, 2004.
- [11] C. Bamforth, *Beer: Tap Into the Art and Science of Brewing*, Second Edition. Oxford University Press, Inc., 2003.
- [12] R. Brissart et al., *European Brewing Convention Manual of Good Practice*. Malting Technology, Fachverlag Hans Carl, 2000.
- [13] L. Guido and M. Moreira, “Malting,” in *Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products*, Taylor & Francis Group, LLC, 2013.
- [14] L. Maillard, “Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique,” *Comptes rendus l’Académie des Sci.*, vol. 154, p. 66, 1912.
- [15] D. A. Augustine and G.-A. Bent, “Reducing Acrylamide Exposure: A Review of the Application of Sulfur-Containing Compounds - A Caribbean Outlook” *Eur. J. Nutr. Food Saf.*, vol. 9, no. 3, pp. 192–209, 2019, doi: 10.9734/ejnf/2019/v9i330058.
- [16] H. Y. Wang, H. Qian, and W. R. Yao, “Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity” *Food Chem.*, vol. 128, no. 3, pp. 573–584, 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.075.
- [17] G. P. Rizzi, “Chemical structure of colored Maillard reaction products” *Food Rev. Int.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–28, 1997, doi: 10.1080/87559129709541096.
- [18] D. B. MacDougall and M. Granov, *Relationship between Ultraviolet and Visible*

Spectra in Maillard Reactions and CIELAB Colour Space and Visual Appearance, vol. 95, no. 30. Woodhead Publishing Limited, 2005.

- [19] F. J. Morales, C. Romero, and S. Jiménez-Pérez, "Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems" *Food Chem.*, vol. 57, no. 3, pp. 423–428, 1996, doi: 10.1016/0308-8146(95)00245-6.
- [20] M. van Boekel *et al.*, "A review on the beneficial aspects of food processing" *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 54, no. 9, pp. 1215–1247, 2010, doi: 10.1002/mnfr.200900608.
- [21] B. Structure, A. Activity, A. Martinez-gomez, I. Caballero, and C. A. Blanco, "Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants" vol. 10, p. 400, 2020.
- [22] L. Rifai and F. A. Saleh, "A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies" *Int. J. Toxicol.*, vol. 39, no. 2, pp. 93–102, 2020, doi: 10.1177/1091581820902405.
- [23] F. Jousse, T. Jongen, W. Agterof, S. Russell, and P. Braat, "Simplified kinetic scheme of flavor formation by the Maillard reaction" *J. Food Sci.*, vol. 67, no. 7, pp. 2534–2542, 2002, doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08772.x.
- [24] M. A. J. S. Van Boekel, "Formation of flavour compounds in the Maillard reaction" *Biotechnol. Adv.*, vol. 24, no. 2, pp. 230–233, 2006, doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.11.004.
- [25] M. Winter, F. Gautschi, I. Flament, M. Stoll, and I. M. Goldman, "Furan Flavouring Agents" GB1156480A, 1966.
- [26] J. J. Verendel, T. L. Church, and P. G. Andersson, "Catalytic one-pot production of small organics from polysaccharides" *Synthesis (Stuttg.)*, no. 11, pp. 1649–1677, 2011, doi: 10.1055/s-0030-1260008.
- [27] E. Capuano and V. Fogliano, "Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies" *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 4, pp. 793–810, 2011, doi: 10.1016/j.lwt.2010.11.002.
- [28] A. B. Merlo, V. Vetere, J. M. Ramallo-López, F. G. Requejo, and M. L. Casella, "Liquid-phase furfural hydrogenation employing silica-supported PtSn and PtGe catalysts prepared using surface organometallic chemistry on metals techniques" *React. Kinet. Mech. Catal.*, vol. 104, no. 2, pp. 467–482, 2011, doi: 10.1007/s11144-011-0374-4.
- [29] P. Y. Nikolov and V. A. Yaylayan, "Thermal decomposition of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) and its further transformations in the presence of glycine" *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 18, pp. 10104–10113, 2011, doi: 10.1021/jf202470u.
- [30] T. M. Aida *et al.*, "Dehydration of d-glucose in high temperature water at pressures up to 80 MPa" *J. Supercrit. Fluids*, vol. 40, no. 3, pp. 381–388, 2007, doi: 10.1016/j.supflu.2006.07.027.
- [31] C. Janzowski, V. Glaab, E. Samimi, J. Schlatter, and G. Eisenbrand, "5-Hydroxymethylfurfural: Assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione" *Food Chem. Toxicol.*, vol. 38, no. 9, pp. 801–809, 2000, doi: 10.1016/S0278-6915(00)00070-3.
- [32] R. Ulbricht, S. Northup, and J. Thomas, "A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions" *Fundam. Appl. Toxicol.*, vol. 4, no. 5, pp. 843–

- 853, 1982, doi: 10.1016/0272-0590(84)90106-4.
- [33] H. Glatt and Y. Sommer, *Health risks of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds*, no. 67. Woodhead Publishing Limited, 2006.
- [34] B. H. Monien, H. Frank, A. Seidel, and H. Glatt, "Conversion of the common food constituent 5-hydroxymethylfurfural into a mutagenic and carcinogenic sulfuric acid ester in the mouse in vivo" *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 22, no. 6, pp. 1123–1128, 2009, doi: 10.1021/tx9000623.
- [35] T. E. Journal, "Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Furfural and Furfural Diethylacetal" *EFSA J.*, vol. 67, pp. 1–27, 2004, doi: 10.2903/j.efsa.2004.67.
- [36] K. C. Hernandez, É. A. Souza-Silva, C. F. Assumpção, C. A. Zini, and J. E. Welke, "Validation of an analytical method using HS-SPME-GC/MS-SIM to assess the exposure risk to carbonyl compounds and furan derivatives through beer consumption" *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, vol. 36, no. 12, pp. 1808–1821, 2019, doi: 10.1080/19440049.2019.1672897.
- [37] "Fragrance raw materials monographs" *Food Chem. Toxicol.*, vol. 20, no. 6, p. 751, 1982, doi: 10.1016/s0015-6264(82)80217-4.
- [38] G. A. Channell, H. Yahya, and D. J. Cook, "Thermal volatile generation in barley malt: On-line MS studies" *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 68, no. 4, pp. 175–182, 2010, doi: 10.1094/ASBCJ-2010-0715-01.
- [39] H. Yahya, R. S. T. Linforth, and D. J. Cook, "Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: A time course study" *Food Chem.*, vol. 145, pp. 378–387, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.046.
- [40] W. Filipowska *et al.*, "Determination of optimal sample preparation for aldehyde extraction from pale malts and their quantification via headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography and mass spectrometry" *J. Chromatogr. A*, vol. 1612, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460647.
- [41] P. Bustillo Trueba *et al.*, "Monitoring the evolution of free and cysteinylated aldehydes from malt to fresh and forced aged beer" *Food Res. Int.*, vol. 140, 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2020.110049.
- [42] Y. Kim, Y. C. Lee, and K. O. Kim, "Optimum roasting and extraction conditions and flavor characteristics of roasted malt extract" *Cereal Chem.*, vol. 75, no. 3, pp. 282–288, 1998, doi: 10.1094/CCHEM.1998.75.3.282.
- [43] H. M. Woffenden, J. M. Ames, and S. Chandra, "Relationships between antioxidant activity, color, and flavor compounds of crystal malt extracts" *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 5524–5530, 2001, doi: 10.1021/jf010583b.
- [44] M. Hellwig and T. Henle, "Maillard Reaction Products in Different Types of Brewing Malt" *J. Agric. Food Chem.*, vol. 68, no. 48, pp. 14274–14285, 2020, doi: 10.1021/acs.jafc.0c06193.
- [45] J. R. Santos and J. A. Rodrigues, "Characterization of volatile carbonyl compounds in defective green coffee beans using a fan assisted extraction process" *Food Control*, vol. 108, no. June 2019, p. 106879, 2020, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106879.
- [46] S. Uchiyama, Y. Inaba, and N. Kunugita, "Derivatization of carbonyl compounds

- with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 879, no. 17–18, pp. 1282–1289, 2011, doi: 10.1016/j.jchromb.2010.09.028.
- [47] European Brewery Convention Analytica, “Method 4.2 - Moisture content of Malt,” 2005.
- [48] J. Miller and J. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Sixth Edition. Harlow: Pearson Education Limited, 2010.
- [49] Y. Chi *et al.*, “Determination of carbonyl compounds in the atmosphere by DNPH derivatization and LC-ESI-MS/MS detection” *Talanta*, vol. 72, no. 2, pp. 539–545, 2007, doi: 10.1016/j.talanta.2006.11.018.
- [50] S. Reichel, D. O. Carvalho, J. R. Santos, P. Bednar, J. A. Rodrigues, and L. F. Guido, “Profiling the volatile carbonyl compounds of barley and malt samples using a low-pressure assisted extraction system” *Food Control*, vol. 121, 2021, doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107568.
- [51] United States Environmental Protection Agency, “CompTox Chemicals Dashboard.”
<https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID1020647>
(Consultado a 20 de julho de 2021).
- [52] National Center for Biotechnology Information, “5-hydroxymethylfurfural Compound Summary.” <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-hydroxymethylfurfural> (Consultado a 20 de julho de 2021).