



Mestrado em Química Analítica

**DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS  
COMPOSTOS VOLÁTEIS NO *QUEIJO DE  
ÉVORA* AO LONGO DA MATURAÇÃO**

Maria Giraldes Pietra Torres

**Orientadora:** Prof. Doutora Ana Maria Costa Freitas

“Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri”



Mestrado em Química Analítica

**DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS  
COMPOSTOS VOLÁTEIS NO *QUEIJO DE  
ÉVORA* AO LONGO DA MATURAÇÃO**

Maria Giraldes Pietra Torres



156 901

**Orientadora:** Prof. Doutora Ana Maria Costa Freitas

“Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri”

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof. Doutora Ana Maria Costa Freitas, por ter aceite a orientação deste trabalho, pelo apoio e incentivo que permitiram que eu o concluísse.

À Prof. Doutora Cristina Pinheiro, pela sua disponibilidade, motivação e amizade.

Um agradecimento especial à Eng.<sup>a</sup> Graça Machado, por “toda a paciência do mundo”.

À Eng.<sup>a</sup> Benedita Salema e à Eng.<sup>a</sup> Marlene Risso da Queijaria SOPÉ S.A., pelo fornecimento dos queijos e pela atenção dispensada.

A todos os “colegas” do Núcleo da Mitra: Vera, Luís, Ana, Ana Elisa, Doroteia, Isabel, Elsa,..., pelos momentos divertidos.

À Prof. Doutora M<sup>a</sup> João Cabrita, pela maneira como contribuiu para que eu finalizasse o trabalho.

À minha família por todo o apoio, principalmente ao António e muito em especial ao meu pai.

## **RESUMO**

As características do aroma do queijo estão associadas aos compostos voláteis formados durante a maturação. A microextração em fase sólida permite o isolamento destes compostos da matriz.

Avaliaram-se as fibras carboxeno/polidimetilsiloxano, polidimetilsiloxano /divinilbenzeno e polidimetilsiloxano, efectuando a extração do espaço de cabeça de uma mistura modelo.

Selecionou-se a fibra polidimetilsiloxano/divinilbenzeno para a extração dos compostos voláteis do queijo, a sua separação e identificação realizou-se por cromatografia gasosa - espectrometria de massa. Na identificação recorreu-se à ionização por impacto electrónico, ionização química e à espectrometria de massa em múltiplas etapas.

A composição volátil do queijo de Évora foi avaliada em três fases da maturação; encontraram-se 20 compostos. Entre a primeira e as restantes fases observam-se diferenças qualitativas, entre a segunda e a terceira detectam-se apenas diferenças quantitativas.

Para comparação do perfil global do aroma nas diferentes fases, recorreu-se ao nariz electrónico. Obteve-se uma diferenciação entre a primeira fase e as duas restantes.

# **DETERMINATION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE COMPOUNDS IN *ÉVORA CHEESE* DURING RIPENING**

## **ABSTRACT**

The character of cheese aroma is related to volatile compounds formed during ripening. Solid phase microextraction allows the isolation of these compounds from the matrix.

The carboxen/polydimethylsiloxane, polydimethylsiloxane/divinylbenzene and polydimethylsiloxane fibres were evaluated through headspace extraction of a model mixture.

The polydimethylsiloxane/divinylbenzene fibre was chosen for extraction of volatile compounds from cheese, the separation and identification was done by gas chromatography – mass spectrometry. For identification electron impact, chemical ionization and tandem mass spectrometry were employed.

The composition in volatiles of *Évora* cheese was evaluated in three stages of ripening; 20 compounds were found. Qualitative differences were observed between the first and the following two stages, quantitative differences were detected between the second and third stages.

For comparison of the global aroma profile of the individual stages, the electronic nose was used. A separation between the first stage and the following two was attained.

## ABREVIATURAS USADAS

<b>amu</b>	Unidade de massa atómica (atomic mass unit)
<b>CAR</b>	Carboxeno
<b>CI</b>	Ionização química ( <i>chemical ionization</i> )
<b>CW</b>	<i>Carbowax</i>
<b>DVB</b>	Divinilbenzeno
<b>EI</b>	Impacto electrónico ( <i>electron impact</i> )
<b>EN</b>	Nariz electrónico ( <i>electronic nose</i> )
<b>FID</b>	Detector de ionização de chama ( <i>flame ionization detector</i> )
<b>GC</b>	Cromatografia gasosa ( <i>gas chromatography</i> )
<b>GLM</b>	Modelo linear geral ( <i>General Linear Model</i> )
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta precisão ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
<b>HS</b>	Espaço de cabeça ( <i>headspace</i> )
<b>HS-SPME</b>	Microextração em fase sólida do espaço de cabeça
<b>MS</b>	Espectrometria de massa ( <i>Mass spectrometry</i> )
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de massa em múltiplas etapas
<b>PA</b>	Poliacrilato
<b>PCA</b>	Análise de componentes principais ( <i>Principal Component Analysis</i> )
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>SBSE</b>	Extração por absorção em barra de agitação ( <i>Stir bar sorptive extraction</i> )
<b>SDE</b>	Extração e destilação simultânea ( <i>Simultaneous distillation extraction</i> )
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida ( <i>solid phase extraction</i> )
<b>SPME</b>	Microextração em fase sólida ( <i>Solid phase microextraction</i> )
<b>Tg</b>	Temperatura de transição vítrea ( <i>Glass transition temperature</i> )

## ÍNDICE GERAL

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>O AROMA DO QUEIJO</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Formação dos compostos voláteis no queijo</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1.1</b>	<b>Metabolismo da lactose, lactato e citrato</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1.2</b>	<b>Proteólise e catabolismo de aminoácidos</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1.3</b>	<b>Lipólise e metabolismo de ácidos gordos</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Contribuição dos compostos voláteis para o aroma</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>ANÁLISE INSTRUMENTAL DO AROMA</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Preparação da Amostra: isolamento e concentração dos compostos do aroma</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1.1</b>	<b>Extracção estática</b>	<b>12</b>
<b>1.2.1.2</b>	<b>Extracção dinâmica</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1.3</b>	<b>Adsorção</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1.4</b>	<b>Absorção</b>	<b>15</b>
<b>1.2.1.5</b>	<b>Extracção do espaço de cabeça</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Técnicas de extracção/concentração de compostos do aroma</b>	<b>17</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Microextracção em fase sólida (SPME)</b>	<b>20</b>
<b>1.2.3.1</b>	<b>Extracção dos analitos</b>	<b>22</b>
<b>1.2.3.2</b>	<b>Tempo de extracção</b>	<b>24</b>
<b>1.2.3.3</b>	<b>Temperatura de extracção</b>	<b>25</b>
<b>1.2.3.4</b>	<b>Fase estacionária</b>	<b>25</b>
<b>1.2.3.4.1</b>	<b>Polidimetilsiloxano (PDMS) e Poliacrilato (PA)</b>	<b>26</b>
<b>1.2.3.4.2</b>	<b>Outras fases estacionárias</b>	<b>26</b>
<b>1.2.3.5</b>	<b>Aplicações do SPME</b>	<b>27</b>
<b>1.2.3.5.1</b>	<b>Desenvolvimento e inovação na aplicação do SPME</b>	<b>28</b>
<b>1.2.4</b>	<b>Instrumentação analítica</b>	<b>29</b>
<b>1.2.4.1</b>	<b>Cromatografia gasosa (GC)</b>	<b>29</b>
<b>1.2.4.2</b>	<b>Cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS)</b>	<b>29</b>
<b>1.2.4.2.1</b>	<b>Ionização por impacto electrónico</b>	<b>30</b>
<b>1.2.4.2.2</b>	<b>Ionização química</b>	<b>31</b>
<b>1.2.4.3</b>	<b>Nariz Electrónico</b>	<b>32</b>

---

---

<b>1.3</b>	<b>O QUEIJO DE ÉVORA</b>	<b>33</b>
<b>1.4</b>	<b>OBJECTIVOS DO TRABALHO</b>	<b>34</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>2.1.</b>	<b>PADRÕES E AMOSTRAS</b>	<b>35</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Escolha dos padrões</b>	<b>35</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Escolha da matriz</b>	<b>36</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Preparação da mistura modelo</b>	<b>37</b>
<b>2.1.4.</b>	<b>Fabrico do Queijo / Amostras</b>	<b>38</b>
<b>2.2</b>	<b>EXTRACÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ESPAÇO DE CABEÇA POR SPME</b>	<b>38</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Optimização das condições de análise</b>	<b>38</b>
<b>2.2.1.1</b>	<b>Fibras de SPME</b>	<b>38</b>
<b>2.2.1.2</b>	<b>Temperatura</b>	<b>39</b>
<b>2.2.1.3</b>	<b>Tempo</b>	<b>39</b>
<b>2.2.1.4</b>	<b>Factores e Linearidade da Resposta</b>	<b>40</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Extracção dos compostos voláteis do queijo por SPME</b>	<b>41</b>
<b>2.3</b>	<b>ANÁLISE DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ESPAÇO DE CABEÇA POR CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)</b>	<b>42</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Cromatografia gasosa - Detector de ionização de chama (GC-FID)</b>	<b>42</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Cromatografia gasosa – Espectrometria de massa (GC-MS)</b>	<b>43</b>
<b>2.3.2.1</b>	<b>MS em múltiplas etapas (MS/MS)</b>	<b>43</b>
<b>2.3.2.2</b>	<b>Ionização química (CI)</b>	<b>44</b>
<b>2.4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>45</b>
<b>2.5</b>	<b>ANÁLISE DO AROMA GLOBAL USANDO O NARIZ ELECTRÓNICO</b>	<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>MISTURA MODELO: MATRIZ E PADRÕES</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DAS FIBRAS CAR/PDMS, PDMS/DVB E PDMS</b>	<b>47</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Temperatura de extracção</b>	<b>47</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Tempo de extracção</b>	<b>49</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Factores de Resposta e Linearidade</b>	<b>51</b>
<b>3.3</b>	<b>COMPOSTOS VOLÁTEIS NO QUEIJO DE ÉVORA</b>	<b>54</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Identificação dos compostos voláteis extraídos do queijo</b>	<b>54</b>
<b>3.3.1.1</b>	<b>Interpretação de espectros de massa</b>	<b>59</b>

---



<b>3.3.2</b>	<b>Variação dos compostos voláteis ao longo da maturação</b>	63
<b>3.3.2.1</b>	<b>Ácidos Gordos</b>	64
<b>3.3.2.2</b>	<b>Outros Compostos Voláteis</b>	66
<b>3.4</b>	<b>AROMA GLOBAL DO QUEIJO DE ÉVORA</b>	69
<b>3.4.1</b>	<b>Aroma global do queijo de Évora ao longo da maturação analisado pelo nariz electrónico</b>	69
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	72
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	73
	<b>ANEXO I</b>	A.1
	<b>Fabrico do Queijo</b>	A.1
	<b>Registo do peso, altura e diâmetro dos queijos recolhidos</b>	A.1
	<b>ANEXO II</b>	A.2
	<b>Resultados obtidos por GC-FID para a avaliação das fibras CAR/PDMS, PDMS/DVB e PDMS</b>	A.2
	▪ temperatura de extracção	A.3
	▪ tempo de extracção	A.4
	▪ factores de resposta e linearidade	A.6
	▪ rectas de calibração	A.9
	<b>ANEXO III</b>	A.12
	<b>Espectros de massa obtidos para o 3-metilbutanol, 2,5-dimetil-3-hexanol, composto não identificado e ácido nonanóico</b>	A.12
	<b>ANEXO IV</b>	A.14
	<b>Resultados obtidos na análise de compostos voláteis do queijo</b>	A.14
	▪ análise de variância (ANOVA)	A.15

---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.1:</b> Vias bioquímicas que levam à formação dos compostos do aroma - a superfície a cinzento indica os compostos que contribuem para o aroma (adaptado de Marilley & Casey, 2004)	2
<b>Figura 1.2:</b> Vias para o metabolismo do citrato em lactococci citrato-positivas e <i>Leuconostoc</i> sp. (McSweeney & Sousa, 2000)	4
<b>Figura 1.3:</b> Lipólise e catabolismo de ácidos gordos livres (Collins <i>et al.</i> , 2003)	6
<b>Figura 1.4:</b> Estrutura do polidimetilsiloxano (PDMS), um absorvente comum com Tg=-125°C (Baltussen <i>et al.</i> , 2002)	16
<b>Figura 1.5:</b> Sistema para a extracção por SPME adaptado de (Vas & Vekey, 2004)	21
<b>Figura 1.6:</b> Procedimento de extracção do e.c. por SPME e desadsorção térmica no GC, adaptado de Kataoka <i>et al.</i> , 2004	22
<b>Figura 1.7:</b> Efeito do tempo na quantidade de analito extraído (Supelco 2001a)	24
<b>Figura 1.8:</b> Extracção por absorção (a) e adsorção (b) imediatamente após a exposição ( $t = 0$ ) e após atingir o tempo de extracção ( $t = t_e$ ) (Chen, 2004)	27
<b>Figura 1.9:</b> Espectrómetro de armadilha de iões (Bouchonnet <i>et al.</i> , 2004)	30
<b>Figura 1.10:</b> Leite de ovelha cru, queijo fresco e queijo curado	33
<b>Figura 3.1:</b> Cromatograma obtido por GC-FID da extracção da mistura modelo ( $\alpha$ -pineno, 2-hexanona, 2-pentanol, octanal, decanoato de etilo, ácido octanóico e $\delta$ -dodecalactona) com a fibra PDMS/DVB. Condições cromatográficas descritas em <i>Material e Métodos</i> no ponto 2.3.1	47
<b>Figura 3.2:</b> Efeito da temperatura de extracção na área cromatográfica (valor médio e desvio padrão) de cada composto na extracção com a fibra CAR/PDMS	48
<b>Figura 3.3:</b> Efeito da temperatura de extracção na área cromatográfica (valor médio e desvio padrão) de cada composto na extracção com a fibra PDMS/DVB	48
<b>Figura 3.4:</b> Efeito da temperatura de extracção na área cromatográfica (valor médio e desvio padrão) de cada composto na extracção com a fibra PDMS	48
<b>Figura 3.5:</b> Perfil de extracção de cada composto (valor médio da área cromatográfica e desvio padrão) ao longo do tempo (10, 20, 30 e 40min) com a fibra CAR/PDMS	50

---

---

<b>Figura 3.6:</b> Perfil de extracção de cada composto (valor médio da área cromatográfica e desvio padrão) ao longo do tempo (5, 10, 20 e 30min) com a fibra PDMS/DVB	50
<b>Figura 3.7:</b> Perfil de extracção de cada composto (valor médio da área cromatográfica e desvio padrão) ao longo do tempo (5, 10, 20 e 30min) com a fibra PDMS	50
<b>Figura 3.8:</b> Perfil GC-MS dos compostos voláteis extraídos com a fibra PDMS/DVB de um queijo com 0(a), 21(b) e 42(c) dias de maturação. Condições cromatográficas descritas em <i>Material e Métodos</i> no ponto 2.3.2	55
<b>Figura 3.9:</b> Espectro de massa da acetoina obtido por EI a 70eV <i>full scan</i> (a), por CI com CH <sub>4</sub> a um fluxo de 0,5mL/min (b) e MS/MS com q= 0,30 do fragmento m/z=73 (c).	60
<b>Figura 3.10:</b> Fragmentação possível da acetoina (a) e do fragmento m/z=73 (b)	60
<b>Figura 3.11:</b> Espectro de massa do ácido hexanóico obtido por EI a 70eV <i>full scan</i> (a) e por CI com CH <sub>4</sub> a um fluxo de 0,5mL/min (b)	61
<b>Figura 3.12:</b> Espectro de massa do ácido 2,4-hexadienóico obtido por EI a 70eV <i>full scan</i> (a) e MS/MS com q= 0,30 do ião molecular m/z = 112 (b) e do fragmento m/z=67 (c).	63
<b>Figura 3.13:</b> Fragmentação possível do ácido 2,4-hexadienóico (a) e do fragmento m/z=67 (b)	63
<b>Figura 3.14:</b> Efeito da maturação (0, 21 e 42 dias) na quantidade de ácidos gordos	66
<b>Figura 3.15:</b> Efeito da maturação (0, 21 e 42 dias) na quantidade de compostos voláteis	67
<b>Figura 3.16:</b> “Impressão digital” obtida com o <i>Alpha-Fox 3000</i> na análise de um queijo com 42 dias de maturação	70
<b>Figura 3.17:</b> Discriminação das amostras de queijo com 0 (1-vermelho), 21 (2-azul) e 42 (3-verde) dias de maturação obtida pela PCA efectuada pelo software <i>AlphaSoft</i>	70
<b>ANEXO</b>	
<b>Figura II.1:</b> Cromatograma obtido por GC-FID da extracção da mistura modelo ( $\alpha$ -pineno, 2-hexanona, 2-pentanol, octanal, decanoato de etilo, ácido octanóico e $\delta$ -dodecalactona) com a fibra CAR/PDMS. Condições cromatográficas descritas em <i>Material e Métodos</i> no ponto 2.3.1	A.2
<b>Figura II.2:</b> Cromatograma obtido por GC-FID da extracção da mistura modelo ( $\alpha$ -pineno, 2-hexanona, 2-pentanol, octanal, decanoato de etilo, ácido octanóico e $\delta$ -dodecalactona) com a fibra PDMS. Condições cromatográficas descritas em <i>Material e Métodos</i> no ponto 2.3.1	A.2

---

<b>Figura II.3:</b> Rectas de calibração obtidas para a extracção com a fibra CAR/PDMS	A.9
<b>Figura III.1:</b> Espectro de massa do 3-metilbutanol obtido por EI a 70eV <i>full scan</i> (a), por CI com CH <sub>4</sub> a um fluxo de 0,5mL/min (b)	A.12
<b>Figura III.2:</b> Espectro de massa do 2,5-dimetil-3-hexanol obtido por EI a 70eV <i>full scan</i> (a), por CI com CH <sub>4</sub> a um fluxo de 0,5mL/min (b)	A.12
<b>Figura III.3:</b> Espectro de massa do composto não identificado obtido por EI a 70eV <i>full scan</i>	A.12
<b>Figura III.4:</b> Espectro de massa do ácido nonanóico obtido por EI a 70eV <i>full scan</i>	A.13

---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Descrição de características apresentadas por alguns compostos voláteis no aroma do queijo	10
<b>Tabela 2.1:</b> Fórmula, peso molecular e temperatura de ebulição dos compostos usados como padrões (NIST Livro de Química na Web <a href="http://webbook.nist.gov/chemistry/">http://webbook.nist.gov/chemistry/</a> )	35
<b>Tabela 2.2:</b> Concentração dos padrões (mg/Kg) nas misturas (M1, M2, M3, M4 e M5)	37
<b>Tabela 2.3:</b> Concentração do ácido octanóico e da $\delta$ -dodecalactona (mg/Kg) nas misturas (M1, M2 e M3) contendo cada um dos compostos isolados	37
<b>Tabela 2.4:</b> Iões percursores seleccionados em cada segmento da corrida cromatográfica para a análise MS/MS	44
<b>Tabela 3.1:</b> Factor de resposta absoluto (FR) e valor de $r^2$ da regressão linear dos compostos extraídos das misturas M1-M5 com as fibras CAR/PDMS e PDMS/DVB	52
<b>Tabela 3.2:</b> Identificação dos compostos voláteis no queijo de Évora: número do pico no cromatograma, identificação a partir da comparação com padrões, comparação com espectros de massa das bibliotecas (MS NIST, Wiley), obtenção de informação adicional por análise de espectro CI (CI identificação M+1 <sup>+</sup> ) e espectros MS/MS (MS/MS informação estrutural)	57
<b>Tabela 3.3:</b> Compostos voláteis no queijo de Évora em três fases da maturação (0, 21 e 42 dias). Valores médios em unidades arbitrárias (área do pico); médias seguidas de letras idênticas na mesma linha não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) devido ao efeito fase da maturação	64
<b>ANEXO</b>	
<b>Tabela I.1:</b> Registos do fabrico do Lote 1 e Lote 2	A.1
<b>Tabela I.2:</b> Registo do peso, altura e diâmetro dos queijos (Q1, Q2 e Q3) dos Lotes 1 e 2, com 0, 21 e 42 dias de maturação	A.1
<b>Tabela II.1:</b> Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos na extracção com a fibra CAR/PDMS a diferentes temperaturas (40, 60 e 80°C)	A.3
<b>Tabela II.2:</b> Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos na extracção com a fibra PDMS/DVB a diferentes temperaturas (40, 60 e 80°C)	A.3
<b>Tabela II.3:</b> Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos na extracção com a fibra PDMS a diferentes temperaturas (40, 60 e 80°C)	A.3
<b>Tabela II.4:</b> Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos para os diferentes tempos de	A.4

extracção (10, 20, 30 e 40min) com a fibra CAR/PDMS

**Tabela II.5:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos para os diferentes tempos de extracção (5, 10, 20 e 30min) com a fibra PDMS/DVB A.4

**Tabela II.6:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos para os diferentes tempos de extracção (5, 10, 20 e 30min) com a fibra PDMS A.5

**Tabela II.7:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto na extracção com a fibra CAR/PDMS das mistura modelo M1, M2 ,M3, M4 e M5 A.6

**Tabela II.8:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto na extracção com a fibra PDMS/DVB das mistura modelo M1, M2 ,M3, M4 e M5 A.6

**Tabela II.9:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto na extracção com a fibra PDMS das mistura modelo M1, M2 ,M3, M4 e M5 A.7

**Tabela II.10:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão obtidos na extracção das misturas M1, M2 e M3 (contendo o ácido octanóico e  $\delta$ -dodecalactona isolados) com a fibra PDMS/DVB A.8

**Tabela IV.1** Valores médios da área cromatográfica obtida na extracção de cada queijo (1,2 e 3) de cada fase de maturação (0, 21 e 42 dias) A.14

**Tabela IV.1** Valores da análise ANOVA para a fase de maturação (FM) de 0, 21 e 42 dias A.15

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O AROMA DO QUEIJO

A aceitabilidade de um produto alimentar, e em particular do queijo, depende das suas propriedades sensoriais, constituindo o aroma um dos principais critérios de escolha para o consumidor, quer do ponto de vista positivo quer negativo (Ayad *et al.*, 2004; Bellesia *et al.*, 2003; Pinho *et al.*, 2003; Barron *et al.*, 2005). O aroma é uma propriedade organoléptica apreendida pelo órgão do olfacto por via retro-nasal (Berodier *et al.*, 1997; Rothe, 1988), cujas características no queijo estão intimamente ligadas aos compostos voláteis formados durante o processo de maturação (Fernández-García *et al.*, 2004; Belitz *et al.*, 2004).

Tem sido realizado um grande volume de trabalho para caracterizar o perfil de compostos voláteis em diferentes variedades de queijo, tais como, o italiano Grana Parmigiano-Reggiano (Bellesia *et al.*, 2003), os franceses Gouda e Emmental (Dirinck & De Winne, 1999), o queijo Rãs do Egipto (Ayad *et al.*, 2004), os espanhóis Cabrales, Idazábal, Mahón, Manchego, Roncal e Zamorano (Taborda *et al.*, 2003; Barron *et al.*, 2005) e o inglês Cheddar (Avsar *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2004).

A composição em voláteis de queijos portugueses foi já abordada em conjunto com os atributos sensoriais no queijo de ovelha Terrincho (Pinho *et al.*, 2004), e também no queijo de Évora (Pinheiro, 2001) e associada à composição microbiológica no queijo Serra da Estrela (Partidário *et al.*, 1998; Tavaría, *et al.* 2002).

### 1.1.1 Formação dos compostos voláteis no queijo

Durante a maturação do queijo, uma série de processos bioquímicos complexos vão levar ao desenvolvimento do aroma, a partir dos principais constituintes do leite: proteínas (caseína), lípidos (triacilgliceróis), lactose e citrato (Madkor *et al.*, 2000; Marilley & Casey, 2004; Costa *et al.*, 2004). Diferentes agentes vão contribuir para a produção dos compostos voláteis, tais como, os enzimas do leite e do agente coagulante e diferentes microorganismos que podem pertencer à microflora indígena

e/ou ser adicionados como culturas de arranque (Martinez-Cuesta *et al.*, 2001; Ayad *et al.*, 2004; Madkor *et al.*, 2000). A acção conjunta destes agentes, que depende também das condições de humidade e temperatura, resulta num complexo balanço entre os compostos voláteis e não voláteis formados, que é responsável pelo aroma singular de cada variedade de queijo (Belitz *et al.*, 2004; Fernandez-Garcia *et al.*, 2004a; Ayad *et al.*, 2004).

As principais vias bioquímicas que ocorrem durante a maturação do queijo são (Figura 1.1): o metabolismo da lactose e citrato, a lipólise com a libertação de ácidos gordos livres e uma série de reacções catabólicas associadas, a proteólise da caseína com a libertação de uma grande variedade de péptidos e aminoácidos livres e as subsequentes reacções catabólicas dos aminoácidos (McSweeney & Sousa, 2000; Martinez-Cuesta *et al.*, 2001).

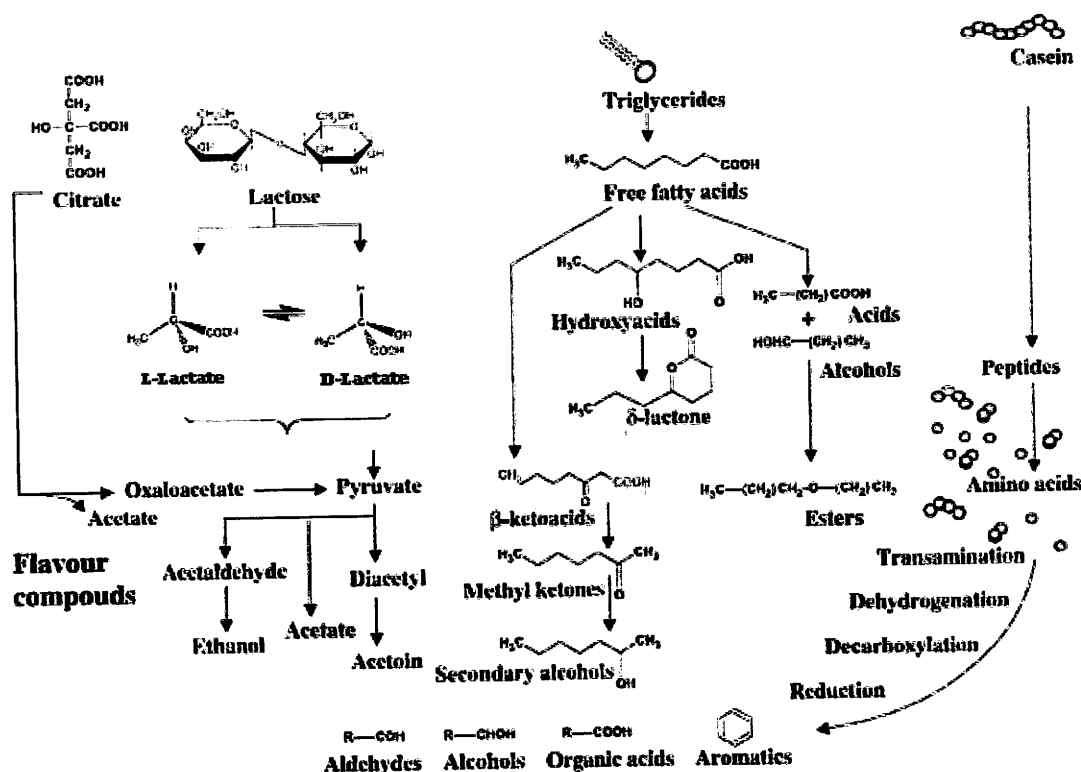


Figura 1.1: Vias bioquímicas que levam à formação dos compostos do aroma - a superfície a cinzento indica os compostos que contribuem para o aroma (adaptado de Marilley & Casey, 2004)



### 1.1.1.1 Metabolismo da lactose, lactato e citrato

Os principais produtos do metabolismo da lactose são o L- ou D-lactato, ou uma mistura racémica de ambos, embora também se possam formar outros produtos consoante as espécies de microorganismos presentes (McSweeney & Sousa, 2000; Marilley & Casey, 2004). A produção de lactato e consequente acidificação do queijo tem um efeito indirecto sobre aroma, já que determina a capacidade de tamponamento, afectando assim o crescimento de vários microorganismos e também a actividade enzimática durante a maturação (McSweeney & Sousa, 2000).

Dependendo da variedade de queijo, o subsequente metabolismo do lactato pode levar à produção de diversas substâncias que contribuem para o aroma (McSweeney & Sousa, 2000), o piruvato que se forma é o material de partida para a formação de variados compostos de cadeia curta como o diacetil, acetoína, acetatos, acetaldeído e etanol (Marilley & Casey, 2004; Belitz *et al.*, 2004).

O citrato, também constituinte do leite, é metabolizado por microorganismos citrato-positivos que não utilizam o citrato como fonte de energia, mas metabolizam-no em conjunto com a lactose ou outro açúcar, deste metabolismo os principais componentes do aroma que se formam são acetatos, o diacetil, a acetoína e o 2,3-butanediol (FIGURA 1.2) (McSweeney & Sousa, 2000; Marilley & Casey, 2004).

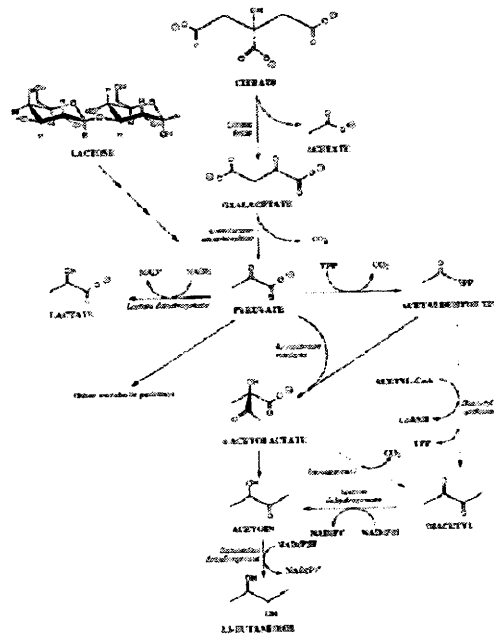


Figura 1.2: Vias para o metabolismo do citrato em lactococci citrato-positivas e *Leuconostoc* sp. (McSweeney & Sousa, 2000)

### 1.1.1.2 Proteólise e catabolismo de aminoácidos

A proteólise da caseína é o evento mais complexo da maturação do queijo, tem uma contribuição directa no sabor através da libertação de péptidos e aminoácidos (Yvon *et al.*, 1997; Martinez-Cuesta *et al.*, 2001; Marilley & Casey, 2004; McSweeney & Sousa, 2000), muitas vezes associados ao sabor amargo que é geralmente considerado um aspecto negativo. (Belitz *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2001) A proteólise não contribui apenas para a formação do aroma, mas afecta também a textura do queijo (Belitz *et al.*, 2004).

Na maioria dos casos a hidrólise inicial das caseínas é catalizada por enzimas contidos no agente coagulante vegetal, o extracto da flor do cardo *Cynara L.* (Roseiro *et al.*, 2003), ou no agente coagulante animal como a quimosina e a pepsina, e em menor extensão por enzimas do leite como a plasmina, catepsina D e outras proteinases de células somáticas. A produção de pequenos péptidos e aminoácidos livres é executada pela acção de proteinases e peptidases microbianas (McSweeney & Sousa, 2000; Sousa *et al.*, 2001), processo em que as bactérias lácticas têm um papel importante (Yvon *et al.*, 1997; Martinez-Cuesta *et al.*, 2001).

Os aminoácidos libertados não contribuem directamente para o aroma, mas indirectamente como precursores de outros compostos (Yvon *et al.*, 1997; Martinez-Cuesta *et al.*, 2001), que incluem a amónia, aminas, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos, fenóis e indole, contribuindo todos para o aroma do queijo (Tabela 1.1) (McSweeney & Sousa, 2000).

O catabolismo dos aminoácidos consiste, em termos gerais, em três passos de um processo complexo: ao primeiro pertencem reacções como a descarboxilação, desaminação, transaminação, dessulfuração e hidrólise das cadeias laterais; o segundo passo envolve a conversão dos compostos resultantes (aminas e  $\alpha$ -cetoácidos), e também dos próprios aminoácidos livres em aldeídos, principalmente por acção de desaminases sobre as aminas; o terceiro passo corresponde à redução dos aldeídos em álcoois ou à sua oxidação em ácidos carboxílicos (Tavaria *et al.*, 2002; McSweeney & Sousa, 2000; Yvon *et al.*, 1997; Belitz *et al.*, 2004). Os enzimas das bactérias lácticas são os principais agentes envolvidos neste processo (Martinez-Cuesta *et al.*, 2000; Yvon *et al.*, 1997). Estas bactérias como flora adventícia surgem do ambiente da queijaria ou do próprio leite, são encontradas em números reduzidos no dia do fabrico mas tornam-se dominantes no queijo maturado (Kieronczyk *et al.*, 2003).

### 1.1.1.3 Lipólise e metabolismo de ácidos gordos

A lipólise dos triacilgliceróis do leite durante a maturação do queijo deve-se à presença de enzimas lipolíticos: hidrolases que quebram a ligação éster entre um ácido gordo e o glicerol com a formação de ácidos gordos livres, mono e diacilgliceróis (Collins *et al.*,

2003; McSweeney & Sousa, 2000; Marilley & Casey, 2004). Os enzimas lipolíticos consistem em esterases ou lipases que podem ser provenientes do leite, do preparado do agente coagulante, de bactérias que crescem no leite ou de microorganismos que se desenvolvem durante a maturação (Alewijn *et al.*, 2005; McSweeney & Sousa, 2000; Nogueira *et al.*, 2005).

Os ácidos gordos livres, especialmente os de cadeia curta e média, contribuem directamente para o aroma, mas além disso estes compostos são também os precursores de uma série de reacções catabólicas que levam à produção de outras moléculas como ésteres, lactonas, (metil-) cetonas, aldeídos e álcoois secundários (Collins *et al.*, 2003; McSweeney & Sousa, 2000; Martinez-Cuesta *et al.*, 2001; Alewijn *et al.*, 2005; Curioni & Bosset, 2002) que apresentam geralmente características distintas para o aroma e baixos limites de percepção (Nogueira *et al.*, 2005).

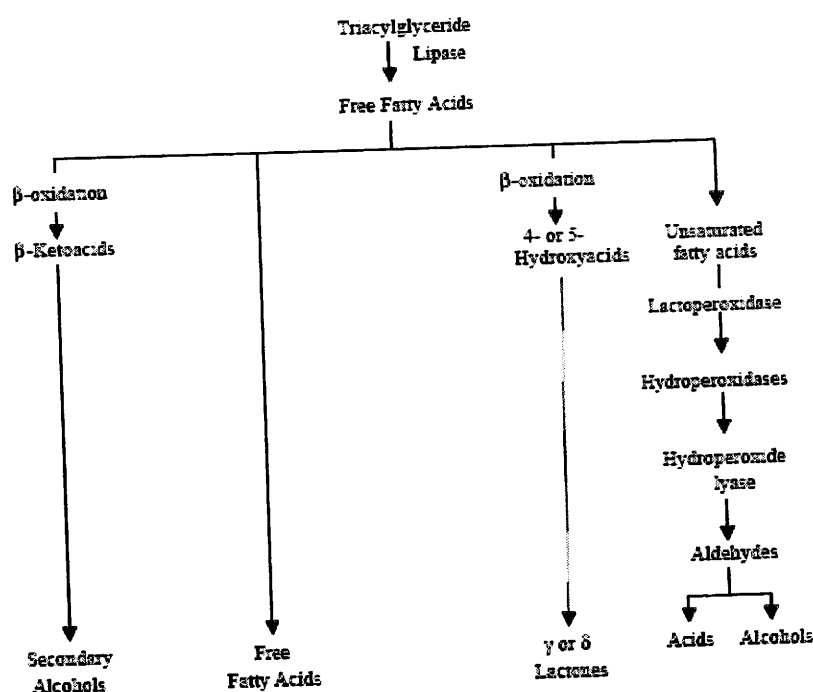


Figura 1.3: Lipólise e catabolismo de ácidos gordos livres (Collins *et al.*, 2003)

Os ésteres são alguns dos compostos voláteis mais comuns no queijo, formam-se por reacções de esterificação que ocorrem entre ácidos gordos de cadeia curta e média e

álcoois primários e secundários derivados da fermentação da lactose ou do catabolismo de aminoácidos (Collins *et al.*, 2003; Curioni & Bosset, 2002; Bellesia *et al.*, 2003; Marilley & Casey, 2004; Engels *et al.*, 1997). Este processo está associado ao metabolismo de leveduras, de algumas bactérias lácticas e também a reacções químicas, sendo a disponibilidade de álcoois (principalmente etanol) o factor limitante da síntese de ésteres (Holland *et al.*, 2005; Fernández-García *et al.*, 2004a). Da reacção dos ácidos gordos livres com grupos sulfidrilos livres formam-se tioésteres (Collins *et al.*, 2003; McSweeney & Sousa, 2000).

As lactonas são ésteres cíclicos que se formam por esterificação intramolecular de ácidos gordos hidroxilados com a perda de água e formação de uma estrutura cíclica (Nogueira *et al.*, 2005), sendo as principais lactonas no queijo as  $\gamma$ - e as  $\delta$ -lactonas (McSweeney & Sousa, 2000). A formação de ácidos gordos hidroxilados ocorre geralmente por oxidação na glândula mamária (Collins *et al.*, 2003). A formação das  $\gamma$ - e  $\delta$ -lactonas a partir do ácido gordo hidroxilado correspondente ocorre espontaneamente, desde que o ácido gordo tenha sido libertado pela lipólise (McSweeney & Sousa, 2000). As lactonas podem também ser formadas a partir de ácidos gordos insaturados por acção de lipoxigenases. O potencial para a produção de lactonas depende de factores como a alimentação, a fase da lactação e a raça do animal (Collins *et al.*, 2003).

As cetonas com número de carbonos par ou ímpar são produtos de variações nas vias metabólicas microbianas usuais para a degradação de lípidos (Bellesia *et al.*, 2003). A  $\beta$ -oxidação e descarboxilação dos ácidos gordos livres levam à formação de metil-cetonas que dominam o aroma dos queijos de bolor azul. A taxa de produção de metil-cetonas no queijo depende de factores como a temperatura, pH, estado fisiológico do bolor e concentração de ácidos gordos (Collins *et al.*, 2003). As metil-cetonas podem ser reduzidas nos correspondentes álcoois secundários, um processo que é reversível em condições aeróbias (McSweeney & Sousa, 2000; Belitz *et al.*, 2004; Fernández-García *et al.*, 2004).

---

Os aldeídos lineares são derivados da auto-oxidação de ácidos gordos insaturados (Bellesia *et al.*, 2003), este processo ocorre com a formação de hidroperóxidos, que por sua vez são degradados em hidrocarbonetos, alcoóis e nos compostos carbonilo (Ziino *et al.*, 2005).

### 1.1.2 Contribuição dos compostos voláteis para o aroma

Embora tenham sido identificados centenas de compostos na fracção volátil do queijo, apenas uma pequena parte contribui de facto para o aroma (Frank *et al.*, 2004; Belitz *et al.*, 2004; Curioni & Bosset, 2002). Baseado na avaliação sensorial e na análise química têm sido identificados vários grupos de compostos como sendo responsáveis pelo aroma final do queijo, nestes incluem-se ácidos gordos, ésteres, aldeídos, alcoóis, metil-cetonas, compostos sulfurados, hidrocarbonetos e lactonas (Ayad *et al.*, 2004; Taborda *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004).

Os ácidos gordos de cadeia curta e média apresentam baixos limites de percepção sensorial contribuindo para o perfil do aroma de uma grande variedade de queijos (Nogueira *et al.*, 2005), sendo no entanto muito variável consoante o tipo de queijo a concentração de ácidos gordos livres adequada para um efeito positivo sobre o aroma, concentrações excessivas podem resultar num aroma a ranço (Nogueira *et al.*, 2005; Marilley & Casey, 2004; Pinheiro 2001; Ziino *et al.*, 2005; Curioni & Bosset, 2002).

Os ésteres, em especial os ésteres etílicos fornecem um carácter frutado e floral; além disso contribuem para o aroma do queijo minimizando as notas desagradáveis derivadas dos ácidos gordos (Curioni & Bosset, 2002; Nogueira *et al.*, 2005).

Aos aldeídos alifáticos são associados aromas herbáceos (Ziino *et al.*, 2005). A presença de  $\gamma$  e  $\delta$ -lactonas é importante para o aroma final, pois fornecem notas frutadas e apresentam reduzidos limites de percepção. As notas a manteiga de um queijo pouco curado devem-se à presença de compostos como o diacetil (Belitz *et al.*, 2004). Os compostos sulfurados produzem a nota a sulfuroso, fornecendo notas a alho ao queijo *Camembert* curado (Marilley & Casey, 2004).

---

Um outro grupo de compostos da fracção volátil do queijo são os terpenos que derivam da alimentação dos animais produtores de leite. Estes são componentes importantes em queijos fabricados em regiões alpinas e de forma artesanal, surgindo das plantas que constituem a mistura de forragens da pastagem (Curioni & Bosset, 2002; Panseri *et al.*, 2004). A contribuição de terpenos para o aroma do queijo permanece, no entanto, controversa (Curioni & Bosset, 2002).

O impacto global de qualquer componente único é função da sua concentração total, da sua interacção com outros compostos voláteis e da sua interacção com a matriz (Nogueira *et al.*, 2005). No queijo o limite de percepção de um composto é fortemente dependente da matriz e de outros componentes que podem modificar a qualidade da percepção organoléptica de um dado composto (Marilley & Casey, 2004). Entre os compostos do aroma é dada especial atenção àqueles que fornecem um impacto característico ao aroma do produto (Belitz *et al.*, 2004; Curioni & Bosset, 2002).

Na tabela 1.1 apresentam-se alguns exemplos das notas para o aroma conferidas por alguns compostos voláteis no queijo.

Tabela 1.1: Descrição de características apresentadas por alguns compostos voláteis no aroma do queijo

composto	descrição	referência
<b>derivados do metabolismo da lactose e citrato</b>		
acetoína	notas a manteiga e a coalhada ácida	Nogueira <i>et al.</i> , 2005; Costa <i>et al.</i> , 2004
diacetil	notas a manteiga	Beliz <i>et al.</i> , 2004; Horne <i>et al.</i> , 2005
acetaldeído	doce, pungente, verde	Curioni & Bosset, 2002
<b>derivados da degradação de aminoácidos</b>		
3-metilbutanal e 2-metilpropanal	notas doces, frutadas, a maçã, a queijo	Marilley & Casey, 2004; Nogueira <i>et al.</i> , 2005
3-metilbutanol, 2-metilbutanol e 2-metilpropanol	odor alcoólico, notas frutadas	Marilley & Casey, 2004
ácidos isovalérico, 2-metilbutírico e isobutírico	aromas doces, a ranço, fecal, pútrido e a fruta podre	Marilley & Casey, 2004
benzaldeído	amêndoa amarga	Marilley & Casey, 2004
feniletanol	aroma floral	Curioni & Bosset, 2002
metional	batata/vegetais cozidos	Curioni & Bosset, 2002
<b>derivados da degradação de ácidos gordos</b>		
2-heptanona	musty, sweet, moldy, varnish	Curioni & Bosset, 2002 ; Frank <i>et al.</i> , 2004
2-nonanona	floral, frutado, a pêssego	Curioni & Bosset, 2002; Frank <i>et al.</i> , 2004
ésteres etílicos	frutados e florais	Curioni & Bosset, 2002
$\delta$ -dodecalactona	nota leve a pêssego, aroma doce, a queijo, a coco	Frank <i>et al.</i> , 2004 ; Curioni & Bosset, 2002
$\delta$ -decalactona	nota a pêssego, coco e natas	Curioni & Bosset, 2002
ácido butanóico e hexanóico	forte, pungente, a queijo	Nogueira <i>et al.</i> , 2005
ácido octanoico	estábulo, ranço, pungente	Costa <i>et al.</i> , 2004 Curioni & Bosset, 2002 Nogueira <i>et al.</i> , 2005
nonanal	herbáceo	Nogueira <i>et al.</i> , 2005
<b>terpenos</b>		
$\alpha$ -pineno	erva, verde	Curioni & Bosset, 2002
linalool	doce, floral, laranja	Curioni & Bosset, 2002
L-carvona	herbáceo	Curioni & Bosset, 2002



## 1.2 ANÁLISE INSTRUMENTAL DO AROMA

O objectivo da análise da fracção volátil de um alimento consiste na maioria dos casos em relacionar a sua composição com os atributos sensoriais. A elucidação da composição do aroma de qualquer alimento é levada a cabo em vários passos, devendo ser conduzidas em conjunto análises instrumentais e sensoriais. Os compostos do aroma estão incluídos em diferentes classes químicas, e geralmente a concentração da maioria dos componentes é inferior aos limites de detecção dos detectores usados na instrumentação analítica (Aishima, T. 2004; Belitz *et al.*, 2004).

Embora actualmente nenhum método possa ilustrar rigorosamente a composição do aroma de uma amostra, o primeiro passo na sua análise consiste no isolamento dos compostos da matriz e na sua concentração, os procedimentos baseiam-se na sua volatilidade e solubilidade em solventes orgânicos, pois são características partilhadas por estes compostos (Supelco 1998; Aishima, T. 2004; Krings *et al.*, 2003).

O método de escolha para a separação dos compostos do aroma é a cromatografia gasosa (GC), acoplada à espectrometria de massa (MS) torna-se uma ferramenta poderosa para a identificação dos compostos presentes.

Um instrumento inovador em que é feita uma abordagem da análise do aroma global é o nariz electrónico (EN), recentemente denominado *e-nose*, que consiste num sistema de sensores combinados que foram desenvolvidos com o objectivo de mimetisar o sistema olfactivo humano. Embora esta aproximação não tenha tido o sucesso esperado, é possível conseguir alguns resultados na classificação do aroma usando técnicas de reconhecimento de padrões, tais como a análise de componentes principais (PCA) (Aishima, T. 2004).

### 1.2.1 Preparação da Amostra: isolamento e concentração dos compostos do aroma

Embora algumas amostras possam ser directamente analisadas tal como são, a maioria necessita de algum tipo de pré-tratamento para a posterior análise em diferentes

---

instrumentos analíticos. A preparação da amostra desempenha assim um papel essencial para uma análise com sucesso (Hyötyläinen & Riekkola, 2004).

Os objectivos da preparação da amostra são o isolamento dos analitos de interesse e o aumento da selectividade, sensibilidade, confiança, rigor e repetibilidade da análise. Além da extracção, a preparação da amostra requer frequentemente procedimentos de limpeza, no caso de matrizes complexas, e também a pré-concentração dos analitos (Hyötyläinen & Riekkola, 2004; Baltussen *et al.*, 2002; Abdel-Rahim *et al.*, 2000). Os métodos de pré-tratamento devem ser fáceis de manusear e de automatizar (Abdel-Rahim *et al.*, 2000), devem evitar a produção de artefactos (Belitz *et al.*, 2004) e requerer um número de passos mínimo, já que os riscos de perda e contaminação da amostra se agravam com a complexidade do método diminuindo assim a fiabilidade da análise (Hyötyläinen & Riekkola, 2004). Diferentes técnicas têm maior ou menor aptidão para analitos específicos e combinações analitos-matriz (Baltussen *et al.*, 2002).

#### 1.2.1.1 Extracção estática

As técnicas de extracção estática assentam na difusão dos analitos da amostra para uma fase de extracção com o objectivo final de atingir o equilíbrio entre as duas fases. A selecção da fase de extracção baseia-se no princípio de que uma substância tem sempre mais afinidade para uma fase com propriedades semelhantes às da própria substância. Por exemplo para extrair um composto apolar de uma matriz polar, deve ser usado uma fase apolar. Para promover a difusão do analito da amostra para a fase de extracção são muitas vezes usados procedimentos como a agitação, estes afectam apenas o tempo requerido para atingir o equilíbrio, não afectando o próprio equilíbrio nem outras propriedades do processo estático. Em técnicas de extracção estática toda a fase de extracção está em contacto com toda a amostra durante o processo (Baltussen *et al.*, 2002).

O factor mais importante que governa a extracção estática é a constante de distribuição  $K$ , definida como:

## Equação 1

$$K = \frac{C_E}{C_A} = \frac{m_E}{m_A} x \frac{V_A}{V_E} = \frac{m_E}{m_A} x \beta$$

onde  $C_A$  é a concentração do analito na amostra em  $\text{gL}^{-1}$ ,  $C_E$  é a concentração do analito na fase de extracção em  $\text{gL}^{-1}$ ,  $m_A$  é a massa do analito que permanece na amostra em g,  $m_E$  é a massa do analito na fase de extracção em g,  $V_E$  é o volume da fase de extracção em L e  $V_A$  é o volume da amostra em L.  $\beta$  representa a razão de fase do sistema de extracção estático e é definido como  $V_A/V_E$  (Baltussen *et al.*, 2002).

A massa total do analito no sistema pode ser definida como  $m_{\text{tot}}$  ( $= m_E + m_A$ ), rescrevendo a equação 1 tem-se uma expressão mais útil que representa a eficiência da extracção ( $\eta = m_E/m_{\text{tot}}$ ):

## Equação 2

$$\eta = \frac{1}{\beta / K + 1}$$

A eficiência da extracção é usualmente expressa em percentagem, e como tal é geralmente conhecida como recuperação (Baltussen *et al.*, 2002).

Da equação 2 é importante notar que os únicos dois termos que afectam a recuperação da extracção são  $\beta$  e  $K$ . Para constantes de partição muito elevadas o numerador tende para a unidade levando a uma recuperação 100%. Razões de fase muito grandes (volume da fase de extracção muito pequeno comparado com o volume da amostra) levam a um numerador elevado e consequentemente a uma recuperação baixa (Baltussen *et al.*, 2002).

Na prática  $K$  é uma constante mais ou menos fixa que depende principalmente das propriedades do analito, das características da amostra e da fase de extracção.  $\beta$  é escolhido através da selecção dos volumes das fases usados, de forma a assegurar uma recuperação elevada com a menor quantidade de fase de extracção possível. Deve ser no entanto notado que em condições estáticas a extracção nunca está

completa e que uma parte dos analitos permanece sempre na amostra mesmo que o valor de  $K$  seja muito elevado e o valor de  $\beta$  seja muito reduzido (Baltussen *et al.*, 2002).

Como a extracção estática assenta na distribuição dos compostos no equilíbrio e não na extracção exaustiva, pode ser considerada uma técnica fácil, fiável e directa. No entanto deve ser assegurado que o valor de  $K$  se mantenha igual em todos os ensaios, mantendo constantes todos os factores que vão influenciar o equilíbrio químico, como por exemplo a temperatura que tem um efeito dominante sobre as constantes de equilíbrio e distribuição (Baltussen *et al.*, 2002).

### 1.2.1.2 Extracção dinâmica

Na extracção dinâmica o contacto entre a fase de extracção e a amostra não é efectuado todo de uma só vez. Muitas técnicas de extracção dinâmica assemelham-se à cromatografia pois são baseadas numa fase estacionária (usualmente a fase de extracção) e numa fase móvel (usualmente a amostra). Enquanto na extracção estática a agitação e outros processos dinâmicos consistem apenas num meio para que o equilíbrio seja atingido mais rapidamente, em procedimentos de extracção dinâmica estes processos são necessários para assegurar uma extracção completa (Baltussen *et al.*, 2002).

Neste processo, normalmente, uma amostra líquida ou gasosa é passada através da fase de extracção que pode ser um material adsorvente, a concentração dos analitos na fase de extracção irá aumentar entre o início e o final da extracção (Baltussen *et al.*, 2002).

### 1.2.1.3 Adsorção

Muitas técnicas de preparação da amostra actualmente disponíveis assentam no isolamento dos analitos de interesse da amostra (gasosa, líquida ou sólida) usando um material adsorvente. Os adsorventes consistem em materiais porosos com uma área superficial interna elevada (tipicamente  $5-1000\text{m}^2\text{g}^{-1}$ ) e os analitos são temporariamente armazenados na superfície do adsorvente. A libertação dos compostos pode ser feita

por desadsorção térmica ou por desadsorção líquida, em que é feita a remoção dos analitos do material adsorvente usando um solvente orgânico (Baltussen *et al.*, 2002).

A superfície de um adsorvente contém grupos activos (locais de adsorção) onde se vão dar as interacções com os analitos. Dependendo da natureza do adsorvente e do analito a interacção pode ir de ligações muito fracas, tipo *van der Waals*, a interacções muito fortes, como interacções iónicas. A intensidade da interacção também determina qual o processo de desadsorção necessário: a desadsorção com solvente permite quebrar interacções adsorvente-analito fortes, enquanto a desadsorção térmica permite apenas quebrar interacções relativamente fracas (Baltussen *et al.*, 2002).

Na extracção estática com uma fase adsorvente os analitos são retidos numa superfície activa que contem um número fixo de locais de adsorção, durante o processo atinge-se o equilíbrio entre os analitos presentes na amostra e aqueles adsorvidos na superfície da fase de extracção. No entanto a aplicação de adsorventes em extracção estática pode trazer alguns efeitos indesejados; pois na extracção simultânea de diversos analitos vai ocorrer competição entre estes para os mesmos locais de adsorção, além disso, os compostos da matriz que estão presentes em concentrações relativamente elevadas podem bloquear os locais de adsorção levando a resultados imprevisíveis e irreprodutíveis (Baltussen *et al.*, 2002).

#### 1.2.1.4 Absorção

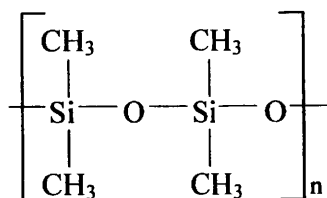
Os absorventes consistem em materiais homogéneos, não porosos, nos quais os analitos podem de facto dissolver-se. Durante a extracção, os analitos não vão sofrer uma ligação ao material, mas são retidos neste por dissolução (Baltussen *et al.*, 2002).

Os materiais absorventes são um grupo de polímeros com uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) inferior à temperatura em que são usados durante o processo extracção-armazenamento-desadsorção. Esta é uma condição altamente relevante, pois a uma temperatura acima da sua  $T_g$  um material polimérico deixa de se comportar como um sólido, assumindo um estado que apresenta propriedades como as constantes de distribuição e constantes de difusão semelhantes às dos solventes

orgânicos. No entanto estes materiais actuam apenas no modo de absorção acima da sua Tg, sendo este mecanismo perdido com o arrefecimento abaixo da sua Tg e tornando-se o polímero num adsorvente com uma área superficial reduzida (Baltussen *et al.*, 2002).

A estabilidade mecânica dos absorventes é usualmente conseguida através de ligações cruzadas, que asseguram que a fase de extracção vai manter a sua forma mesmo a temperaturas elevadas. O aperfeiçoamento dos procedimentos de extracção com fases absorventes diferentes é baseado nas diferentes aproximações e geometrias em que o absorvente é usado (Baltussen *et al.*, 2002).

Um absorvente muito comum é o polidimetilsiloxano (PDMS), este é um polímero de siloxano substituído a 100% com grupos metilo, bastante usado como fase estacionária em cromatografia gasosa. A popularidade deste material deve-se ao facto de ser muito inerte, reduzindo o risco de perdas de analitos instáveis e/ou polares por adsorção irreversível ou por reacção catalítica na superfície (Baltussen *et al.*, 2002)



**Figura 1.4:** Estrutura do polidimetilsiloxano (PDMS), um absorvente comum com Tg=-125°C (Baltussen *et al.*, 2002)

Além dos polímeros acima do seu Tg, também os solventes orgânicos, água e gases ideais são considerados fases de absorção, em que os solutos são retidos puramente por dissolução (em concentrações suficientemente baixas). Concentrações suficientemente elevadas para alterar as propriedades de dissolução são raramente encontradas na prática e a extracção estática por absorção é assim usualmente uma aproximação muito fiável (Baltussen *et al.*, 2002).

### 1.2.1.5 Extracção do espaço de cabeça

Na análise de aromas faz-se frequentemente a extracção dos compostos voláteis presentes no espaço de vapor acima do alimento, por extracção do espaço de cabeça (Bichi *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2004; Povolo, M. & Contarini, G., 2003). O procedimento de extracção do espaço de cabeça é simples: as amostras devem estar seladas, a uma temperatura determinada e deve ser dado tempo para que se estabeleça o equilíbrio entre os compostos voláteis ligados à matriz do alimento e entre os que estão presentes na fase de vapor (Belitz *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2004). A extracção do espaço de cabeça permite que se preservem as características naturais da amostra (Povolo, M. & Contarini, G., 2003).

A extracção pode ser estática, fazendo a amostragem de uma alíquota da fase gasosa acima da amostra ou efectuando a pré-concentração dos compostos presentes. Pode também ser realizada a extracção dinâmica, em que os compostos são arrastados por um gás inerte através de um polímero adsorvente (Povolo, M. & Contarini, G., 2003; Belitz *et al.*, 2004).

A composição do vapor depende de muitas variáveis, sendo um parâmetro crítico para assegurar procedimentos precisos a temperatura. A tendência de uma molécula do aroma evaporar está principalmente ligada ao seu ponto de ebulição, o aumento da temperatura aumenta a pressão parcial de um composto, mas acresce sempre o risco da obtenção de uma composição do aroma não representativa e da formação de artefactos (Krings *et al.*, 2003; Belitz *et al.*, 2004). O comportamento de partição de um composto está também associado à matriz, diferindo consoante os constituintes e as propriedades de ab/adsorção da própria matriz (Baltussen *et al.*, 2002; Krings *et al.*, 2003), o aumento do conteúdo em lípidos diminui consideravelmente a libertação de voláteis para a fase gasosa (Rabe *et al.*, 2002).

### 1.2.2 Técnicas de extracção/concentração de compostos do aroma

Entre os métodos mais comuns usados na preparação da amostra para a análise de aromas, estão a extracção e destilação simultânea (SDE) (Gómez-Ruiz *et al.*, 2002;

Freire, L.V. 2002), a extracção dinâmica do espaço de cabeça (Gardiner *et al.*, 1999; Nogueira *et al.*, 2005), o método *purga-e-armadilha* (Valero *et al.*, 2000; Bugaud *et al.*, 2001), a extracção líquido-líquido e a microextracção em fase sólida (SPME) (Aishima, T 2004).

Durante algumas décadas variações da técnica de SDE forneceram a resposta necessária para a análise dos compostos do aroma. A técnica consiste na extracção combinada com a destilação (a pressão normal ou ligeiramente reduzida) usando um sistema desenhado por Likens e Nickerson, para efectuar a concentração dos compostos voláteis usando solventes com baixo ponto de ebulição (Belitz *et al.*, 2004). Este método permite a obtenção de amostras representativas, mas é crítico na produção de artefactos. Assim, entre as desvantagens do SDE pode-se contar com a perda de alguns dos compostos voláteis, com a oxidação de lípidos, hidrólise de esterres, reacções de Maillard e degradação de açúcares. (Krings *et al.*, 2003)

A destilação em vácuo, outra forma de isolamento dos compostos do aroma permite transferir as moléculas do aroma a temperaturas mais baixas que o SDE (Avsar *et al.*, 2004; Krings *et al.*, 2003). Embora eficiente, esta técnica envolve equipamento delicado e pode ser demasiado moroso para a maioria das aplicações (Frank *et al.*, 2004).

Um método de preparação de amostra atractivo é a extracção em fluido supercrítico que explora as propriedades de um fluido supercrítico (tipicamente o CO<sub>2</sub>). Esta técnica pode ser realizada no modo estático ou dinâmico (Jublot *et al.*, 2004) e pode ser acoplada à cromatografia gasosa. O CO<sub>2</sub> supercrítico apresenta boas propriedades de solvente para compostos apolares, podendo estas propriedades ser modificadas com a adição solventes polares; a eficiência da extracção depende da optimização da pressão e da temperatura que têm de ser ajustadas em conjunto (Hyötyläinen & Riekkola, 2004; Jublot *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2000).

Na extracção dinâmica em fase sólida os compostos voláteis podem ser isolados de uma matriz sólida ou líquida purgando a amostra com um gás inerte (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, He) e fazendo a adsorção dos compostos voláteis num polímero como o *Tenax*, *Porapak Q*, *Chromosorb 105* ou *Carbotrap 20/40*. A recuperação dos compostos pode ser feita por



desadsorção térmica ou recorrendo a solventes (Gardiner *et al.*, 1999; fchem; Nogueira *et al.*, 2005).

Bicchi *et al.* (2004) utilizaram o método de extracção dinâmica em fase sólida do espaço de cabeça para a análise da fracção volátil em matrizes de alimentos, usando a chamada “agulha mágica” introduzida pela *Chromtech* (Idstein, Alemanha), cujas paredes internas são revestidas interiormente com 50µm PDMS e carbono activado (10%). Na extracção do espaço de cabeça, um volume fixo é aspirado com uma seringa de 2,5mL um determinado número de vezes, acumulando-se o analito no polímero. Esta demonstrou ser uma técnica com uma capacidade de concentração elevada, boa repetibilidade e precisão intermédia.

Uma outra técnica frequentemente usada na análise de compostos voláteis, que efectua a extracção e a concentração dos compostos com recurso a equipamento mais sofisticado é a *purga-e-armadilha* (Povolo, M. & Contarini, G., 2003; Bugaud *et al.*, 2001; Taborda *et al.*, 2003; Bellesia *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2004). O processo inclui três passos distintos: a purga com um gás como o He, a adsorção dos analitos numa armadilha (por exemplo *Tenax*) e a desadsorção dos compostos a temperaturas elevadas.

Uma técnica relativamente recente já aplicada na análise de compostos do aroma de vinho (Hayasaka *et al.*, 2003), e também na determinação do aroma do queijo por extracção do espaço de cabeça (Giani *et al.*, 2004), é a extracção por absorção em barra de agitação (SBSE). O processo consiste numa extracção estática através da agitação com uma barra de agitação revestida com PDMS por um tempo determinado, após o tempo de extracção a barra é removida e é feita a desadsorção térmica ou líquida dos analitos (Baltussen *et al.*, 2002). A técnica de SBSE permitiu superar o limite de capacidade de concentração do SPME (Bicchi *et al.*, 2004), em parte devido à maior quantidade de revestimento de PDMS presente (Hayasaka *et al.*, 2003).

### 1.2.3 Microextração em fase sólida (SPME)

O SPME é um método de extração e pré-concentração, que elimina a necessidade de solventes ou equipamento complicado (Supelco, 1998), foi desenvolvido por Arthur e Pawliszyn (1990) na Universidade de Waterloo (Ontario, Canada) para a análise de compostos orgânicos clorados em água. Desde então a aplicação do SPME foi estendida a diversas matrizes líquidas, gasosas e sólidas em campos muito variados como o ambiente, área clínica ou área alimentar (Valor *et al.*, 2001; Doleschall, *et al.* 2003), sendo actualmente considerado um método de preparação de amostra estabelecido (Lee, *et al.* 2003; Pérès, *et al.* 2001; Costa *et al.*, 2004).

O componente chave na técnica de SPME é uma fibra de sílica fundida com comprimento de cerca de 1cm, com um diâmetro externo tipicamente de 150 $\mu$ m, revestida com um polímero (fase estacionária) com uma espessura de 5 a 100 $\mu$ m cujas características influenciam a extração (Xiaogogen & Peppard 1995; Zhang & Pawliszyn 1993; Freitas *et al.*, 2001; Baltussen *et al.*, 2002; Supelco, 1998).

A pequena fibra está contida dentro de uma agulha e ligada a um êmbolo num suporte semelhante a uma seringa (Figura 1.5), que permite expor a fibra para efectuar a extração, retrai-la para o armazenamento e perfurar os septos, tanto do injector como dos frascos das amostras (Baltussen *et al.*, 2002; Supelco, 1998).

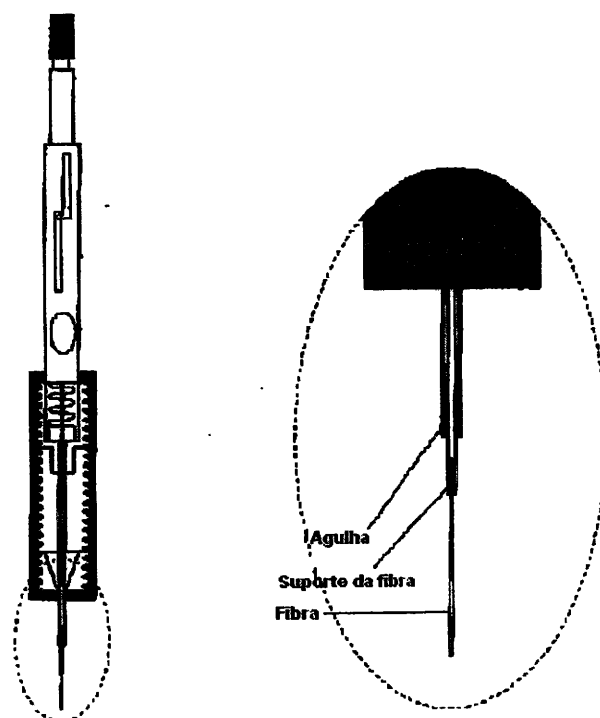
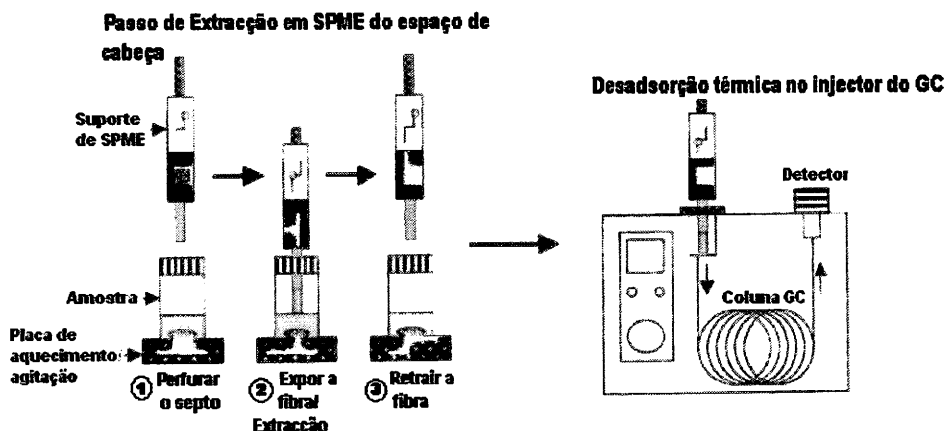


Figura 1.5: Sistema para a extração por SPME adaptado de (Vas & Vekey, 2004)

A extração pode ser efectuada por imersão directa na amostra, no caso de matrizes líquidas, ou por extração do espaço de cabeça, no caso de matrizes líquidas ou sólidas. O septo do recipiente da amostra é perfurado com a agulha e a fibra é exposta, permitindo a partição dos analitos entre a fase estacionária e a matriz ou entre a fase estacionária e a fase de vapor acima da amostra, consoante se fizer a extração por imersão ou do espaço de cabeça (Vas & Vekey, 2004).

Após a extração é feita a desadsorção dos analitos para a separação cromatográfica; pode ser efectuada a desadsorção térmica num injector de um GC sendo o SPME compatível com qualquer coluna de empacotamento ou com um sistema capilar (Baltussen *et al.*, 2002), pode também ser efectuada a desadsorção com solventes numa interface SPME/HPLC, este sistema foi desenvolvido mais recentemente e permitiu o acoplamento do SPME ao HPLC com inúmeras novas perspectivas (Jino *et al.*, 1996; Boland & Pawliszyn, 1996; Valor *et al.*, 2001; Supelco 1998). O processo de

extracção do espaço de cabeça e desadsorção térmica num injector do GC está demonstrado na figura Figura 1.6.



**Figura 1.6:** Procedimento de extracção do por HS-SPME e desadsorção térmica no GC, adaptado de Kataoka *et al.*, 2004

As vantagens associadas à técnica de SPME quando comparada com outros métodos incidem sobre a eliminação do uso de solventes (Arthur & Pawliszyn, 1990) o fácil manuseamento, o tempo de extracção relativamente curto e a fácil automatização (Abdel-Rahim *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2004).

### 1.2.3.1 Extracção dos analitos

A extracção dos analitos de uma matriz por SPME é conseguida através da absorção ou adsorção dos compostos ao revestimento da fibra (Xiong *et al.*, 2003). O processo baseia-se na partição dos compostos entre a amostra e a fase estacionária e pode decorrer até que seja atingido o equilíbrio no sistema (Xiaogogen & Peppard 1995; Zhang & Pawliszyn 1993; Supelco, 1998) ou até que todos os locais de ligação na superfície estejam ocupados (processo de adsorção) (Freitas *et al.*, 2001). O equilíbrio é estabelecido pela concentração do analito nas diferentes fases do sistema, no caso do HS-SPME estão presentes três fases: a matriz, o espaço de cabeça e a fase estacionária da fibra (Supelco 1998; Povolo, M. & Contarini, G., 2003). O equilíbrio entre a fase estacionária e o espaço de cabeça é atingido mais depressa que no caso do

SPME por imersão entre a fase estacionária e a amostra, pois na fase de vapor a difusão dos analitos para o revestimento da fibra é mais rápida (Supelco 1998).

A distribuição do soluto depende das interacções físicas e químicas entre este e as diferentes fases (Abdel-Rahim *et al.*, 2000). A quantidade de analito ab/adsorvido pela fibra depende do tipo de revestimento e da constante de distribuição do analito.

A eficiência do SPME é afectada por factores que podem afectar o equilíbrio e consequentemente a extracção, tais como, o tempo de extracção, a temperatura, que tem um efeito significativo sobre o processo já que determina a pressão de vapor dos analitos (HS-SPME) e também influencia a constante de distribuição, a agitação que no caso de amostras sólidas se torna de menor importância (Freitas *et al.*, 2001), o pH, a força iónica (Abdel-Rahim *et al.*, 2000), a espessura e tipo de revestimento (Belitz *et al.*, 2004; Vas & Vekey, 2004), o volume do recipiente (Supelco, 1998) e variações no estado da fibra (Xiong *et al.*, 2003).

O HS-SPME é ideal para minimizar interferências numa análise, pois evita a contaminação com compostos não voláteis da amostra (Supelco 1998). Os parâmetros essenciais que devem ser otimizados em conjunto na extracção por HS-SPME são: a temperatura de formação do espaço de cabeça, que vai assegurar o equilíbrio entre o espaço de cabeça e a matriz, e o tempo de extracção, que corresponde ao tempo em que a fibra está em contacto com o espaço de cabeça (Pawliszyn, J. 1997). Para ser atingido rigor e precisão na análise é mais importante que seja mantida a consistência em factores críticos da extracção do que atingir o equilíbrio total (Supelco 1998).

Na desadsorção térmica, também os parâmetros como a temperatura do injector, profundidade de inserção da fibra e o tempo de desadsorção devem ser ajustados e uma vez estabelecidos devem ser usados com consistência. A injeção deve ser feita no modo *splitless* para assegurar que a totalidade dos analitos seja transferida para a coluna, adicionalmente, a utilização de um *liner* com um diâmetro interno mais estreito (por ex. 0,75mm em vez de 2mm) torna os picos mais estreitos (Vas & Vekey, 2004; Supelco 1998). A desadsorção de um analito da fibra depende do seu ponto de

ebulição, da espessura do revestimento, do tempo e temperatura de desdessorção (Supelco 1998).

### 1.2.3.2 Tempo de extracção

O tempo de extracção é um parâmetro crítico na amostragem por SPME. A Figura 1.7 apresenta a relação típica entre o tempo e a quantidade de analito extraído pela fibra. A concentração de analito na fibra vai variar até ser atingido o equilíbrio e a partir deste ponto permanecerá constante. O tempo até se atingir o equilíbrio (de alguns minutos a várias horas) vai depender do tamanho dos compostos e do seu coeficiente de difusão, do tipo e espessura da fase estacionária e do modo de extracção (imersão ou espaço de cabeça). O tempo poderá ser mais curto para compostos pequenos (peso molecular <150), revestimentos absorventes e mais finos, usando a técnica de espaço de cabeça e trabalhando com amostras de concentração elevada (Supelco 2001; Vas & Vekey, 2004). Quando se trabalha no período de pré-equilíbrio o controlo preciso do tempo de extracção torna-se mais relevante (Figura 1.7) (Supelco 2001).

O tempo de extracção até ao equilíbrio pode ser diminuído se for usado um procedimento de agitação (Vas & Vekey, 2004).

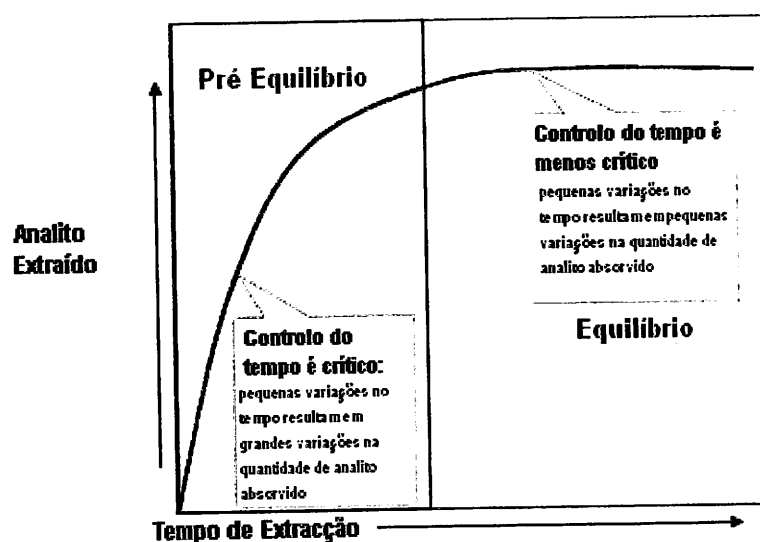


Figura 1.7: Efeito do tempo na quantidade de analito extraído (Supelco 2001a)

### 1.2.3.3 Temperatura de extracção

Também a temperatura afecta o equilíbrio durante a extracção, pois influencia a distribuição dos analitos na amostra, no espaço de cabeça e na fase estacionária da fibra. Variações na temperatura vão alterar o equilíbrio e a resultante concentração do analito nas diferentes fases (Supelco, 2001).

Na análise do espaço de cabeça a temperatura afecta fortemente a libertação de compostos do aroma da matriz (Freitas *et al.*, 2001), sendo necessário estabilizar a temperatura da amostra antes de fazer a exposição da fibra.

### 1.2.3.4 Fase estacionária

A característica principal que determina eficiência analítica do SPME é o tipo e a espessura do revestimento da fibra (Vas & Vekey, 2004). Desde os primeiros estudos da técnica SPME e com a introdução de variados revestimentos poliméricos com propriedades diferentes, muito trabalho tem sido feito na determinação dos mecanismos envolvidos nos processos de extracção e desadsorção (Valor *et al.*, 2001).

A selectividade da extracção pode ser alterada consoante o tipo de fase estacionária e a sua espessura, devendo ser usadas fases estacionárias para as quais as constantes de partição dos compostos sejam elevadas. Analitos apolares são extraídos com maior eficiência com fases estacionárias apolares e analitos polares são extraídos com maior eficiência com revestimentos polares (Supelco, 1998; Vas & Vekey, 2004).

A espessura da fibra vai influenciar a extracção consoante os analitos que se pretendem isolar: um revestimento mais espesso permite a extracção de uma maior quantidade de analito, um revestimento mais fino é usado para assegurar uma difusão e libertação mais rápida dos compostos durante a desadsorção térmica. Um revestimento espesso vai efectivamente extrair compostos de ponto de ebulição elevado da amostra, mas a velocidade de desadsorção vai ser lenta e estes compostos ficam ligados à fibra até ao próximo processo de extracção. Em geral para a extracção de compostos voláteis é requerido um revestimento espesso, enquanto um revestimento fino é mais eficiente para a extracção/desadsorção de analitos semi-voláteis (Supelco, 1998).

#### 1.2.3.4.1 Polidimetilsiloxano (PDMS) e Poliacrilato (PA)

O PDMS é um revestimento apolar em que o mecanismo de extracção consiste maioritariamente na absorção (Zhang & Pawliszyn, 1993; Vas & Vekey, 2004), estando assim a extracção directamente relacionada com a partição do analito entre as diferentes fases (Baltussen *et al.*, 1999). A extracção usando o PDMS é principalmente afectada pelo tamanho e polaridade do analito (Freitas *et al.*, 2001), demonstrando este revestimento uma afinidade elevada na extracção de compostos apolares (Valor *et al.*, 2001).

Para a extracção de analitos mais polares são usados materiais alternativos, como o poliacrilato (PA) (Baltussen *et al.*, 2002), que permite melhores resultados na extracção de compostos polares quando comparado com PDMS (Valor *et al.*, 2001). Também esta fase faz a extracção através da absorção dos analitos que se dissolvem e difundem no revestimento (Vas & Vekey, 2004).

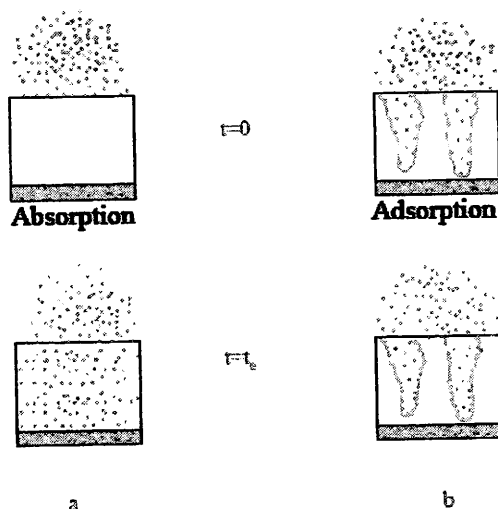
O PDMS foi a primeira fase estacionária utilizada em SPME e foi usado para investigar as equações teóricas do equilíbrio multi-fases do SPME por imersão e do espaço de cabeça em amostras de água, sendo também investigados aprofundadamente os efeitos dos vários parâmetros que afectam a extracção (Valor *et al.*, 2001).

#### 1.2.3.4.2 Outras fases estacionárias

Aumentando o espectro das aplicações de SPME surgiram fases estacionárias mistas como o *carbowax*-divinilbenzeno (CW/DVB), copolímeros do PDMS com o divinilbenzeno (PDMS/DVB) ou o *carbowax* (PDMS/CW) e misturas físicas do PDMS com adsorventes como o carboxeno (CAR/PDMS) (Valor *et al.*, 2001; Baltussen *et al.*, 2002).

Embora estes materiais apresentem de facto um aumento da capacidade de extracção perde-se o mecanismo de absorção puro, pois o CW é usado abaixo do seu T<sub>g</sub> e o CAR é um adsorvente inorgânico (Baltussen *et al.*, 2002). O mecanismo de extracção maioritariamente envolvido é assim a adsorção, os analitos vão ligar-se à superfície da fibra formando uma monocamada (Figura 1.8) (Vas & Vekey, 2004).





**Figura 1.8:** Extração por absorção (a) e adsorção (b) imediatamente após a exposição ( $t = 0$ ) e após atingir o tempo de extração ( $t = t_e$ ) (Chen, 2004)

A aplicação destes materiais pode assim numa extração estática levar a resultados irreprodutíveis, pois vão ocorrer fenómenos de competição entre os analitos e outros componentes da matriz para os locais de adsorção disponíveis (Baltussen *et al.*, 2002). Os compostos com afinidade mais elevada tendem a deslocar as moléculas com afinidade inferior, especialmente se a sua concentração for reduzida (Freitas *et al.*, 2001). Este facto pode tornar a quantificação usando o SPME pouco fiável (Baltussen *et al.*, 2002).

A fase CAR/PDMS  $75\mu\text{m}$  é um material poroso (micro-, meso- e macroporos de 6 a 50 Å) que resulta da mistura de carbono com o PDMS, a fracção CAR (crivo molecular) actua como uma armadilha para os compostos voláteis que poderão ser desadsorvidos apenas a temperaturas elevadas (Müller *et al.*, 1999; Xiong *et al.*, 2003).

### 1.2.3.5 Aplicações do SPME

Desde a sua introdução que a aplicação do SPME se tornou muito abrangente para a análise com sucesso de compostos voláteis e semi-voláteis em matrizes muito diversas, tais como, amostras ambientais, alimentos ou amostras fisiológicas (Doleschall, *et al.* 2003; Lestremau *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2003; Hook *et al.*, 2002; Mazida *et al.*, 2005).

---

Para a análise e identificação (associado ao GC-MS) de compostos que contribuem para o aroma de diferentes produtos alimentares o SPME é frequentemente usado como método de pré-concentração (Supelco1998a), sendo aplicado na extracção de espaço de cabeça de produtos muito diversos, tais como, a planta do alho *Hua gabonii* (Huaceae) (Jirovetz *et al.*, 2002), cogumelos (Diaz *et al.*, 2003) azeitonas (Navarro *et al.*, 2004) ou óleos (Doleschall, *et al.* 2003).

A aplicação do SPME na extracção de compostos voláteis para a caracterização do aroma do queijo foi já efectuada em diversos trabalhos (Pérès *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 2004; Bellesia *et al.*, 2003; Pinho *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004).

#### 1.2.3.5.1 Desenvolvimento e inovação na aplicação do SPME

A técnica de SPME tem sido inovada com o melhoramento de procedimentos analíticos e novas aplicações (Wang *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2005 ; Wu e Pawlisn, 2004 ; Walles *et al.*, 2004).

Os novos desenvolvimentos em SPME podem prender-se com o desenvolvimento e uso de novas fases estacionárias com sensibilidade melhorada na análise de compostos do aroma (Liu *et al.*, 2005), com a utilização de SPME para efectuar a extracção dinâmica do espaço de cabeça na análise quantitativa e qualitativa de compostos em amostras problemáticas permitindo análises mais rápidas com um aumento da sensibilidade (Silva *et al.*, 2004) ou com a realização de procedimentos como a derivatização na própria fibra para a determinação de aldeídos (Wang *et al.*, 2004).

## 1.2.4 Instrumentação analítica

### 1.2.4.1 Cromatografia gasosa (GC)

Já há muito tempo que a cromatografia gasosa (GC) é reconhecida como uma ferramenta poderosa na análise qualitativa e quantitativa de uma ampla gama de amostras em áreas muito distintas.

Na análise de aromas a GC é sem dúvida o método de escolha para separação dos compostos voláteis depois de isolados de diferentes matrizes (Ayad *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2004; Pérèz *et al.*, 2001; Barron *et al.*, 2005; Mazida *et al.*, 2005). O processo cromatográfico pode ser associado à detecção com um detector de ionização de chama (FID), um espectrómetro de massa e ainda à percepção sensorial com a aplicação da GC-Olfactometria (Ruth, 2004; Belitz *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2004).

### 1.2.4.2 Cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS)

A separação por GC acoplada à detecção por espectrometria de massa tornou-se uma ferramenta fundamental na análise de compostos voláteis para caracterização do aroma (Ngassoum *et al.*, 2001; Pinho *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2004; Demyttenaere *et al.*, 2003). A espectrometria de massa é reconhecida como uma técnica sensível e selectiva para a análise/identificação de uma variedade de compostos.

Dentro de uma ampla gama de espectrómetros de massa, o espectrómetro de massa com armadilha de iões tem a vantagem de apresentar modos de operação versáteis, associados a uma flexibilidade de utilização que permite a análise numa etapa única (MS) ou em múltiplas etapas (MS/MS). Além disso os espectrómetros de massa com armadilha de iões permitem uma sensibilidade aumentada devido à sua capacidade de “armadilhar” e acumular os iões (Bouchonnet *et al.*, 2004).

Uma armadilha de iões (Figura 1.9) é constituída por três eléctrodos separados por dois espaçadores; a saída da coluna capilar do GC entra na armadilha de iões através de uma abertura num dos espaçadores. Os analitos são eluídos e ionizados entre os eléctrodos, podendo ser feita a ionização por impacto electrónico (EI) ou a ionização

química (CI). Em qualquer dos modos de ionização (EI ou CI), os electrões são produzidos por um filamento metálico e introduzidos sequencialmente (a 70eV) para a armadilha (Bouchonnet *et al.*, 2004; ThermoFinnigan, 2001), os iões formados são focalizados para o analisador de massa (ThermoFinnigan, 2001).

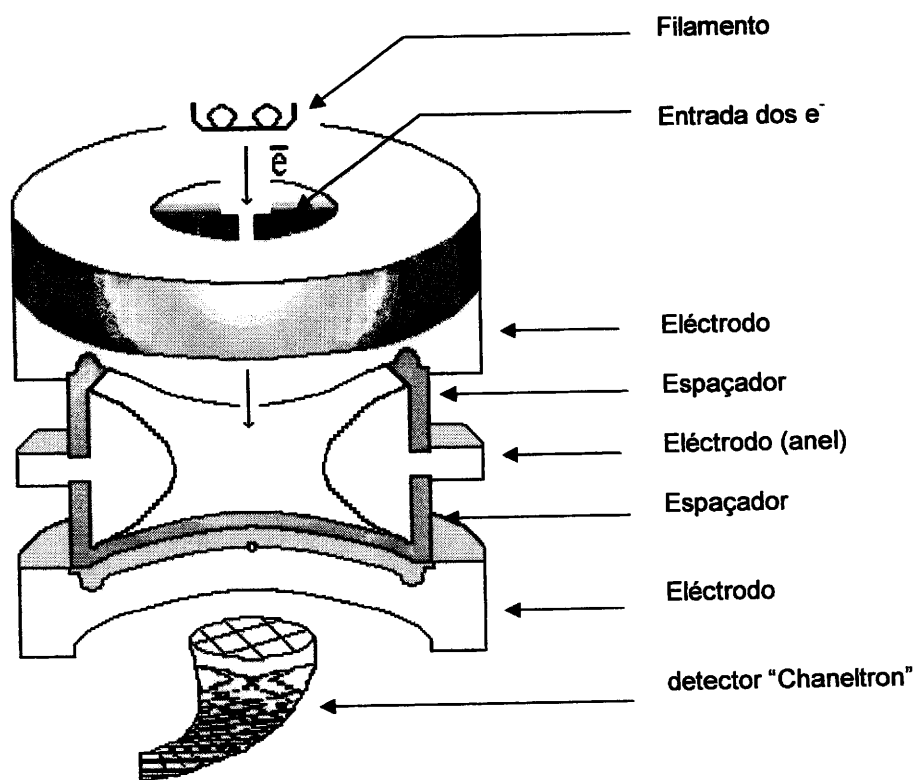


Figura 1.9: Espectrómetro de armadilha de iões (Bouchonnet *et al.*, 2004)

#### 1.2.4.2.1 Ionização por impacto electrónico

A ionização por EI é o modo de ionização usado como rotina, pois permite a identificação dos compostos por comparação com bases de dados (Bouchonnet *et al.*, 2004). Neste modo de ionização os electrões emitidos pelo filamento ao atingirem a nuvem electrónica de uma moléculas poderão remover electrões da camada externa,

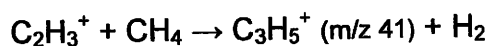
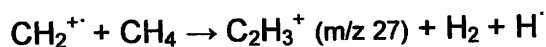
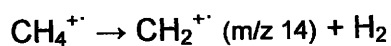
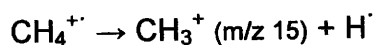
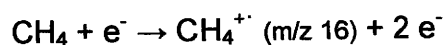
tornando a molécula mais ou menos instável e provocando uma fragmentação diferenciada consoante a sua estrutura.

A aplicação da análise por MS/MS permite a obtenção de um espectro mais limpo, o que se torna muito útil quando é efectuada a análise por GC-MS (Hesse *et al.*, 1997). No MS/MS é feita a refragmentação de uma massa alvo, através do isolamento do fragmento na armadilha de iões e aplicação de uma voltagem que irá determinar a sua fragmentação.

#### 1.2.4.2.2 Ionização química

Na CI é efectuada a ionização de um gás reagente, cujos iões moleculares se fragmentam rapidamente e reagem com moléculas neutras, os gases mais usados são o metano, o isobutano e a amónia (Bouchonnet *et al.*, 2004).

A formação dos iões quando o reagente é o metano envolve as seguintes reacções (Bouchonnet *et al.*, 2004):



As reacções dos iões provenientes da ionização do metano com a molécula M que se pretende analisar e se encontra em concentrações muito inferiores às do reagente, produzem um ião  $MH^+$  abundante e numerosos iões fragmentos derivados de  $M+C_2H_5^+$  (Hesse *et al.*, 1997; Bouchonnet *et al.*, 2004).

A CI é um método útil para a verificação da massa molecular, pois é um método de ionização suave que dá origem a uma baixa fragmentação e à formação do ião molecular e do ião  $M+1^+$ .

### 1.2.4.3 Nariz Electrónico

O nariz electrónico (EN) é um instrumento que se torna muito útil na análise do aroma quando o objectivo é obter a avaliação de um perfil global e não a identificação dos componentes (Freitas *et al.*, 2001a).

O EN é um instrumento desenvolvido para caracterizar um padrão global do aroma de um produto, usando para tal um conjunto de sensores de óxidos metálicos semi-condutores e redes neuronais, que analisam os compostos orgânicos contidos no espaço de cabeça de uma amostra através de um sinal eléctrico (Aishima, 2004; Ampuero & Bosset, 2003). O sistema consiste num *hardware* mais ou menos sofisticado, com sensores, sistemas electrónicos, bombas, controladores de fluxo, e ainda num *software* para monitorização do hardware, processamento dos dados e análises estatísticas (Schaller *et al.*, 1998).

A análise instrumental com o EN baseia-se na reactividade cruzada dos sensores, de forma que produtos com aroma semelhante originem um padrão de resposta dos sensores semelhante, enquanto produtos com aromas diferentes mostram diferenças no padrão da resposta (Ampuero & Bosset, 2003). É então fornecida uma resposta perante determinados compostos voláteis na forma de uma "impressão digital" que pode ser analisada por análise estatística multivariada efectuada pelo *software* do próprio sistema (Pillonel *et al.*, 2004; Schaller *et al.*, 1998).

### 1.3 O QUEIJO DE ÉVORA

A originalidade de um queijo depende de factores como o leite e os procedimentos de fabrico utilizados, estes estão muitas vezes associados à origem geográfica. A qualidade do leite é influenciada pelo clima, pelas características geológicas, pela forragem e pela raça dos animais, enquanto a tecnologia associada ao procedimento de fabrico pode ser influenciada pelas tradições regionais (Barron *et al.*, 2005).

O queijo de Évora é obtido do leite de ovelha cru coagulado por acção do extracto de cardo (*Cynara cardunculus L.*), a sua maturação é efectuada a uma temperatura de 8 a 15°C, com uma humidade de 80 a 95%, por um período mínimo de 30 dias (Figura 1.10). A forma típica deste queijo é um cilindro baixo, apresentando uma consistência dura ou semi-dura, um aspecto untuoso com alguns olhos pequenos e uma cor amarelada. O queijo exibe um cheiro e um sabor característicos, ligeiramente picante e acidulado (Despacho 29/94 de 4 de Fevereiro).

O queijo de Évora é um produto com denominação de origem protegida (D.O.P) através do Despacho 29/94 de 4 de Fevereiro, estando a sua área de produção circunscrita a 17 concelhos do Alentejo.



Figura 1.10: Leite de ovelha cru, queijo fresco e queijo curado

## 1.4 OBJECTIVOS DO TRABALHO

Neste trabalho pretende-se avaliar a utilização da técnica de SPME aliada à separação e identificação por GC-MS na análise química dos compostos voláteis do queijo. A composição do espaço de cabeça será avaliada ao longo da maturação.

Serão avaliadas três fibras de SPME com fases estacionárias diferentes, consideradas adequadas para a extracção dos compostos do aroma, efectuando a extracção dos compostos voláteis de uma mistura modelo. Os parâmetros de extracção (tempo e temperatura) serão optimizados e será seleccionada uma fibra com base na resposta e linearidade apresentada na extracção dos analitos.

Usando a fibra escolhida será feita a extracção por HS-SPME dos compostos voláteis das amostras de queijo de Évora recolhidas em diferentes fases de cura. A separação, identificação e quantificação dos compostos será efectuada por GC-FID e GC-MS.

Será ainda efectuada uma abordagem do perfil global do aroma do queijo recorrendo à análise com o EN.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. PADRÕES E AMOSTRAS

#### 2.1.1. Escolha dos padrões

Os padrões utilizados foram o (1R)-(+)- $\alpha$ -pineno (>97% Aldrich), 2-hexanona (98% Aldrich), 2-pentanol (98% Aldrich), octanal (99% Aldrich), decanoato de etilo (>98% Merck), ácido octanóico (>99% Merck) e  $\delta$ -dodecalactona (99% Aldrich). A tabela 2.1 apresenta as fórmulas químicas, massas moleculares e temperaturas de ebulição dos compostos utilizados.

**Tabela 2.1:** Fórmula, peso molecular e temperatura de ebulição dos compostos usados como padrões (NIST Livro de Química na Web <http://webbook.nist.gov/chemistry/>)

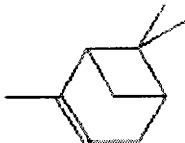
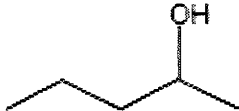



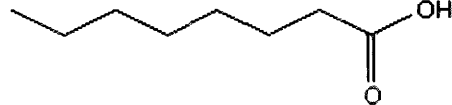
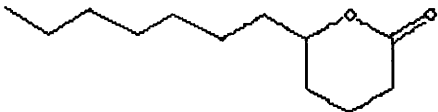
Nome	Fórmula	Estrutura química	Temperatura de ebulição (°C)	Peso Molecular (g/mol)
$\alpha$ -pineno	$C_{10}H_{16}$		157	136.23
2-pentanol	$C_5H_{12}O$		119	88.15
2-hexanona	$C_6H_{12}O$		127	100.16

Tabela 2.1: continuação

Nome	Fórmula	Estrutura química	Temperatura de ebulição (°C)	Peso Molecular (g/mol)
octanal	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O		171	128.21
decanoato de etilo	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		245	200.32
ácido octanóico	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>		237	144.21
δ-dodecalactona	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>		140-141 °C a 1 mm Hg	198.30

### 2.1.2. Escolha da matriz

Como potencial matriz, para a preparação da mistura de padrões, compararam-se os seguintes produtos alimentares: uma coalhada de leite de cabra proveniente da queijaria SOPÉ, S.A., um queijo fresco de leite de ovelha pasteurizado (Quinta da Romã) e a coalhada produzida pela Danone<sup>TM</sup> (*cuajada*).

Efectuaram-se extracções por SPME com a fibra CAR/PDMS (Supelco) de cada um dos produtos ( $T_{\text{extracção}} = 60^{\circ}\text{C}$ ,  $t_{\text{equilíbrio do HS}} = 10 \text{ min}$ ,  $t_{\text{extracção}} = 10 \text{ min}$ ) e avaliou-se a homogeneidade do produto antes e depois deste ser sujeito à temperatura de extracção.

Para o uso como matriz seleccionou-se a coalhada produzida pela Danone<sup>TM</sup> (cuajada).

### 2.1.3. Preparação da mistura modelo

Para a avaliação do método de SPME adicionaram-se os padrões à matriz, de forma a preparar uma mistura modelo contendo os padrões escolhidos em concentrações conhecidas. Homogeneizou-se a mistura 3 vezes durante 1 minuto num homogeneizador de pás (Masticator da IUL).

Para o estudo do tempo e temperatura óptimos prepararam-se misturas com concentrações entre 10 e 20mg/Kg de cada padrão, sendo usada sempre a mesma mistura modelo para cada um dos estudos com cada uma das fibras.

Para a determinação dos factores de resposta absolutos e linearidade da extracção prepararam-se 5 misturas com as concentrações indicadas na tabela 2.2:

Tabela 2.2: Concentração dos padrões (mg/Kg) nas misturas (M1, M2, M3, M4 e M5)

COMPOSTO (mg/Kg)	M1	M2	M3	M4	M5
$\alpha$ -pineno	24,38	9,94	3,95	1,00	0,52
2-hexanona	16,00	6,53	2,59	0,65	0,34
2-pentanol	17,45	7,12	2,82	0,71	0,37
octanal	12,95	5,28	2,10	0,53	0,28
decanoato de etilo	16,46	6,71	2,66	0,67	0,35
ácido octanóico	19,05	7,77	3,08	0,78	0,40
$\delta$ -dodecalactona	18,28	7,46	2,96	0,75	0,39

Para a avaliação do efeito de matriz e/ou de competição na extracção, prepararam-se as misturas M1 a M3 com os compostos individuais.

Tabela 2.3: Concentração do ácido octanóico e da  $\delta$ -dodecalactona (mg/Kg) nas misturas (M1, M2 e M3) contendo cada um dos compostos isolados

COMPOSTO (mg/Kg)	M1	M2	M3
ácido octanóico	24,010	9,635	4,645
$\delta$ -dodecalactona	26,494	10,454	5,849

### 2.1.4. Fabrico do Queijo / Amostras

As amostras de Queijo Évora DOP analisadas foram fabricadas na Queijaria SOPÉ, S.A. (S. Brás do Regedouro, Évora).

Recolheram-se três queijos ( $Q_1$ ,  $Q_2$  e  $Q_3$ ) em três fases da maturação aos 0, 21 e 42 dias (FM = 0, 21 e 42), provenientes de dois lotes de fabrico distintos ( $L_1$  e  $L_2$ ) com 7 dias de intervalo.

Na chegada ao laboratório, os queijos foram codificados, pesados e medidos (altura e diâmetro). Foram partidos em quatro partes, embalados em vácuo e conservados a  $-85^\circ\text{C}$  até serem efectuadas as análises.

## 2.2 EXTRACÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ESPAÇO DE CABEÇA POR SPME

### 2.2.1 Optimização das condições de análise

#### 2.2.1.1 Fibras de SPME

Avaliaram-se três fibras de SPME comerciais (Supelco) com fases estacionárias diferentes: CAR/PDMS ( $75\mu\text{m}$ ), PDMS/DVB ( $65\mu\text{m}$ ) e PDMS ( $100\mu\text{m}$ ), através da extracção dos padrões do espaço de cabeça da mistura modelo preparada.

Após o condicionamento adequado (especificado pelo fabricante), efectuou-se uma injeção em branco com cada uma das fibras (branco da fibra).

Avaliou-se a memória de cada fibra, efectuando uma injeção após um ciclo de extracção/desadsorção. Para evitar a contaminação cruzada as fibras foram colocadas entre cada extracção no injectador nas seguintes condições: CAR/PDMS durante 10min a  $290^\circ\text{C}$ ; PDMS/DVB e PDMS durante 10min a  $250^\circ\text{C}$ .

Determinou-se a temperatura e o tempo de extracção óptimos para as três fibras. Determinaram-se também os factores e linearidade da resposta de cada padrão da mistura modelo.

### 2.2.1.2 Temperatura

Para determinar a temperatura de extracção óptima colocaram-se 2g da mistura padrão num frasco de 10 mL selado com um septo de politetrafluoroetileno (PTFE). Realizou-se a extracção usando uma placa de aquecimento com agitação magnética (RET control-visc da IKA). Efectuou-se o HS-SPME em triplicado com cada uma das fibras nas seguintes condições:

- tempo de equilíbrio do HS: 10min
- tempo de extracção: 20min
- agitação com barra magnética (12mm x 4mm) : 250rpm
- temperatura de extracção: 40°C, 60°C e 80°C

### 2.2.1.3 Tempo

Para determinar o tempo de extracção óptimo colocaram-se 2,0 g da mistura num frasco de 10 mL selado com um septo de PTFE e efectuou-se o SPME em triplicado nas seguintes condições com a fibra CAR/PDMS:

- tempo de equilíbrio do HS: 10min
- temperatura de extracção: 60°C
- agitação com barra magnética (12mm x 4mm ): 250rpm
- tempo de extracção: 10, 20, 30 e 40min

As condições de extracção com a fibra PDMS/DVB foram:

- tempo de equilíbrio do HS: 10min
- temperatura de extracção: 40°C
- agitação com barra magnética (12mm x 4mm): 250rpm

- tempo de extracção: 5, 10, 20 e 30 min

As condições de extracção com a fibra PDMS foram:

- tempo de equilíbrio do HS: 10min
- temperatura de extracção: 60°C
- agitação com barra magnética (12mm x 4mm): 250rpm
- tempo de extracção: 5, 10, 20 e 30 min

#### **2.2.1.4 Factores e Linearidade da Resposta**

Para a determinação dos factores de resposta e linearidade da extracção, efectuaram-se extracções em triplicado às misturas M1 a M5 (Tabela 2.2), colocaram-se 2,00 g da mistura num frasco de 10 mL selado. Efectuou-se o SPME nas seguintes condições para a fibra CAR/PDMS:

- tempo de equilíbrio do HS: 10min
- temperatura de extracção: 60°C
- agitação com barra magnética (12mm x 4mm ): 250rpm
- tempo de extracção: 30 min

As condições de extracção para a fibra PDMS/DVB foram:

- tempo de equilíbrio do HS: 10min
- temperatura de extracção: 40°C
- agitação com barra magnética (12mm x 4mm): 250rpm
- tempo de extracção: 20 min

As condições de extracção para a fibra PDMS foram:

- tempo de equilíbrio do HS: 10min
- temperatura de extracção: 60°C
- agitação com barra magnética (12mm x 4mm): 250rpm
- tempo de extracção: 20 min

Realizaram-se ainda extracções em duplicado com a fibra PDMS/DVB às misturas M1 a M3 (Tabela 2.3) contendo o ácido octanóico ou a  $\delta$ -dodecalactona isolados na matriz.

Calculou-se a regressão linear da resposta do detector (área cromatográfica) em função da concentração usando o *software Microsoft Excell* para cada composto.

### **2.2.2 Extracção dos compostos voláteis do queijo por HS-SPME**

Para efectuar a extracção dos compostos presentes no espaço de cabeça das amostras de queijo seleccionou-se a fibra PDMS/DVB.

Removeu-se uma fina camada da superfície do queijo. Colocaram-se 3,0g de queijo finamente ralado, num frasco de 10mL selado com um septo de PTFE e procedeu-se à extracção (em triplicado) por SPME usando as seguintes condições:

- tempo de equilíbrio do HS: 10min
- temperatura de extracção: 40°C
- tempo de extracção: 20 min

---

## 2.3 ANÁLISE DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ESPAÇO DE CABEÇA POR CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)

### 2.3.1 Cromatografia gasosa - Detector de ionização de chama (GC-FID)

Efectuou-se a separação e detecção por GC-FID (*Focus GC* da ThermoFinnigan) para a análise e quantificação dos compostos da mistura modelo e também para a quantificação dos compostos das amostras de queijo. A aquisição de dados foi efectuada pelo *software Chromeleon 6* da Dionex.

Condições cromatográficas:

- temperatura do injector: 290°C (para a desadsorção da fibra CAR/PDMS) e 250°C (para a desadsorção das fibras PDMS/DVB e PDMS)
- tempo de desadsorção: 3min em modo *splitless*
- *liner* de diâmetro interno 0,8mm (Supelco)
- temperatura do detector: 290°C (CAR/PDMS) e 250°C (PDMS/DVB e PDMS)
- coluna capilar de polietilenoglicol CW20M (30m, 0.32mm ID, 0.25mm espessura de filme) da Restek
- gás de arraste: Hélio a fluxo constante de 1,5mL/min
- programa de temperatura do forno para a separação cromatográfica dos compostos extraídos da mistura modelo: temperatura inicial 50°C durante 5min, aumento a 10°C/min até 210°C, mantidos durante 5min
- programa de temperatura do forno para a separação cromatográfica dos compostos extraídos das amostras de queijo: temperatura inicial 40°C durante 5min, rampa a 5°C/min até 210°C, mantidos durante 5min.



### 2.3.2 Cromatografia gasosa – Espectrometria de massa (GC-MS)

Efectuou-se a separação e detecção por GC-MS (*Trace GC* e *Polaris Q* da ThermoFinnigan) para a análise e identificação dos compostos presentes no espaço de cabeça das amostras de queijo. Analisaram-se amostras de queijo de cada uma das fases de maturação (0, 21 e 42 dias) e ainda os padrões 2-pentanol, hexanoato de etilo (>98% Merck), octanal, 2,3 butanediol (>98% Merck), ácido butanóico (>99% Merck), decanoato de etilo, ácido isovalérico (>99% Extrasynthèse), ácido octanóico, feniletanol (>98% Extrasynthèse), ácido decanóico (>98% Merck), ácido acético (PANREAC 99.7%) e ácido isobutírico (>99% Merck). A aquisição de dados foi efectuada pelo *software Xcalibur*.

Na análise por GC-MS, efectuou-se a desadsorção térmica e a separação cromatográfica como descrita acima para o GC-FID, a análise por MS realizou-se com a coluna analítica directamente acoplada ao espectrómetro de massa de armadilha de iões.

- temperatura da linha de transferência : 250°C
- temperatura da armadilha de iões: 220°C
- análise em *full scan* no intervalo de  $m/z$  de 20 a 300  $m/z$  (velocidade 2,6 *scan/s*).

Identificaram-se os compostos por comparação do espectro de massa e do tempo de retenção com os dos respectivos padrões, quando disponíveis. Identificaram-se os restantes compostos por comparação do espectro de massa obtido com o espectro de massa da biblioteca NIST versão 2.0 (1998) e recorrendo também à ionização química e ao MS/MS.

A determinação do tempo de retenção e espectros de massa dos padrões efectuou-se por injeção directa de uma solução dos padrões em diclorometano (p.a. da Merck).

#### 2.3.2.1 MS em múltiplas etapas (MS/MS)

Efectuou-se a análise MS/MS para os compostos cuja identificação não foi confirmada com padrões. Seleccionaram-se como fragmentos alvo, iões com a massa correspondente ao

ião molecular suspeito e a fragmentos que poderiam fornecer informação estrutural adicional.

Na tabela 2.4 apresentam-se os iões seleccionados como percursos no respectivo segmento da corrida cromatográfica.

**Tabela 2.4:** Iões percursos seleccionados em cada segmento da corrida cromatográfica para a análise MS/MS

segmento da corrida (min)	ião precursor (m/z)
8,70-9,20	88,0
	57,0
10,75-11,70	88,0
	45,0
15,90-16,60	130
	87,0
21,80-22,90	116,0
	101,0
30,10-30,95	112,0
	45,0
	67,0
30,95-32,00	158,0
	45,0

A análise por MS/MS efectuou-se com uma amplitude de excitação 1,0 V, usou-se um valor de radiofrequência  $q = 0,30$  e  $q=0,45$ . A amplitude da janela de isolamento foi 1,0m/z.

### 2.3.2.2 Ionização química (CI)

Efectuou-se a análise CI/MS usando o metano como gás reagente a um fluxo de 0,5mL/min e com a temperatura da fonte iónica a 220°C. Efectuou-se a detecção na gama 20,0 a 300,0 m/z.

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Efectuou-se a análise estatística dos resultados referentes aos compostos voláteis usando o programa *MINI TAB* versão 12. Efectuou-se uma análise de variância (ANOVA) segundo o modelo linear (GLM) para o efeito da fase de maturação (FM= 0, 21 e 42) e uma análise e comparação de médias usando o teste de Tuckey com um nível de significância de 95%.

## 2.5 ANÁLISE DO AROMA GLOBAL USANDO O NARIZ ELECTRÓNICO

Submeteram-se à análise pelo nariz electrónico (EN) 3,0g de cada amostra de queijo (em triplicado) preparada da mesma forma que para a extracção por SPME. O equipamento usado foi o SAS (*Sensor Array System*) *Alpha-Fox 3000* da *Alpha-Mos* com 12 sensores em duas câmaras acoplado ao amostrador automático HS100 *Combi-Pal* (CTC).

A programação do amostrador automático para a formação e extracção do espaço de cabeça foi a seguinte:

- tempo de equilíbrio do HS: 10min
- temperatura: 40° C
- velocidade de agitação: 250 rpm
- volume de injeção : 500 µL

A programação do sistema de sensores foi a seguinte:

- tempo de aquisição de dados: 120 s
- período de aquisição: 0,5 s
- fluxo - 150mL/min

A análise estatística dos resultados consistiu numa análise de componentes principais (PCA) efectuada pelo *software AlphaSoft*.

---

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 MISTURA MODELO: MATRIZ E PADRÕES

Para a avaliação do método de SPME na extracção de compostos voláteis do espaço de cabeça do queijo, pretendeu-se efectuar o estudo das fibras usando uma mistura que representasse um modelo para a análise do aroma no queijo. Foi então necessário encontrar uma matriz à qual fosse possível adicionar os compostos voláteis pretendidos. Esta matriz deveria preencher alguns requisitos, tais como, ter uma composição grosseira semelhante à do queijo, apresentar uma estrutura homogénea, que fosse preservada com o aquecimento até aos valores da temperatura de extracção e não conter compostos que mascarassem aqueles que seriam usados como padrões.

Foram testados três produtos alimentares como potencial matriz: uma coalhada de leite de cabra obtida na fábrica Sopé, um queijo fresco de leite de ovelha pasteurizado (Quinta da Romã) e a coalhada produzida pela Danone<sup>TM</sup> (*cuajada*).

A extracção por SPME da coalhada obtida da SOPÉ revelou a presença de compostos com tempos de retenção coincidentes com os dos padrões escolhidos para a mistura, e tanto este produto, como o queijo fresco comercial embora apresentassem uma estrutura homogénea após a homogeneização, formaram duas fases distintas após o aquecimento à temperatura de extracção. A *cuajada* da Danone<sup>TM</sup> permitiu satisfazer requisitos propostos para a matriz pretendida e assim foi o produto utilizado na preparação da mistura modelo.

A escolha dos padrões para o estudo da técnica de SPME pretendeu cobrir classes químicas diferentes, utilizaram-se compostos já referidos noutros trabalhos como compostos voláteis do queijo (Pinheiro, C. 2001; Pinho *et al.*, 2003; Ayad *et al.*, 2004; Bellesia *et al.*, 2003).

Na Figura 3.1 apresenta-se um cromatograma obtido por extracção da mistura modelo com a fibra PDMS/DVB .

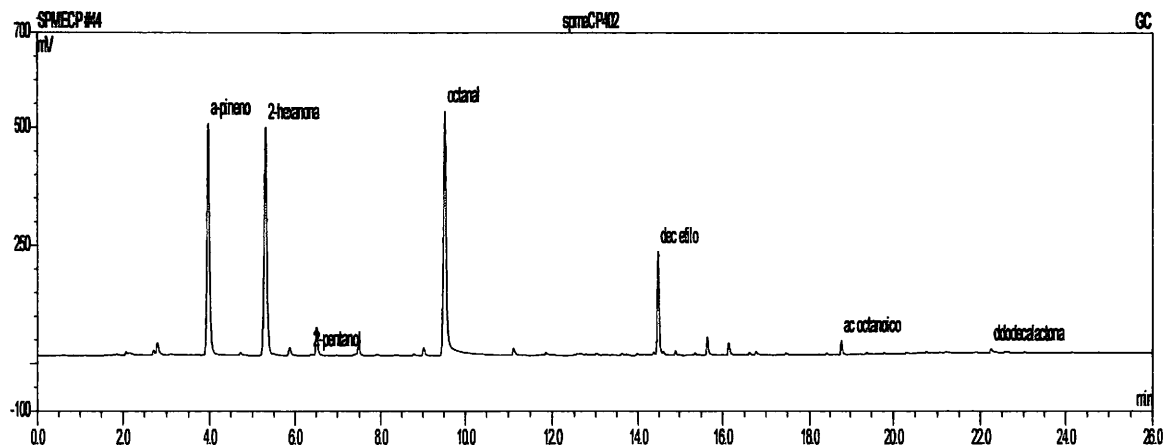


Figura 3.1: Cromatograma obtido por GC-FID da extracção da mistura modelo ( $\alpha$ -pineno, 2-hexanona, 2-pentanol, octanal, decanoato de etilo, ácido octanóico e  $\delta$ -dodecalactona) com a fibra PDMS/DVB. Condições cromatográficas descritas em *Material e Métodos* no ponto 2.3.1

## 3.2 AVALIAÇÃO DAS FIBRAS CAR/PDMS, PDMS/DVB E PDMS

### 3.2.1 Temperatura de extracção

Quando se optimizam as condições de extracção num método de SPME há vários parâmetros que devem ser considerados. Com o objectivo de atingir maior eficiência de extracção, os factores aqui abordados foram a temperatura e o tempo de extracção.

Para identificar a temperatura de extracção mais adequada, foi avaliado o comportamento de cada fibra (CAR/PDMS, PDMS/DVB e PDMS) fazendo a extracção da mistura de padrões a diferentes temperaturas (40, 60 e 80°C).

Nas figuras 3.4 a 3.6 representa-se a área cromatográfica obtida para cada um dos compostos com as diferentes temperaturas de extracção.

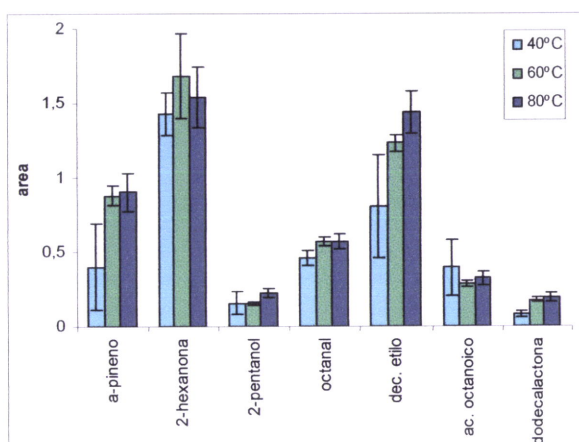


Figura 3.2: Efeito da temperatura de extração na área cromatográfica (valor médio e desvio padrão) de cada composto na extração com a fibra CAR/PDMS

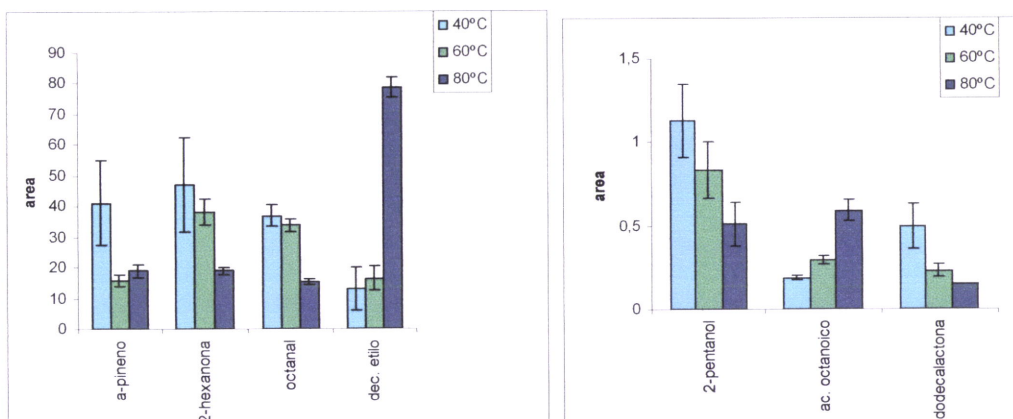


Figura 3.3: Efeito da temperatura de extração na área cromatográfica (valor médio e desvio padrão) de cada composto na extração com a fibra PDMS/DVB

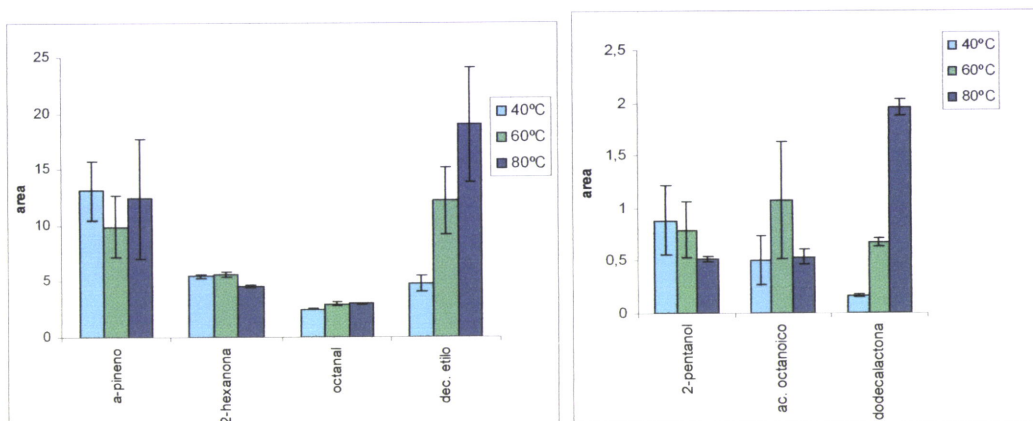


Figura 3.4: Efeito da temperatura de extração na área cromatográfica (valor médio e desvio padrão) de cada composto na extração com a fibra PDMS

Na extracção por HS-SPME espera-se que a temperaturas mais elevadas ocorra uma maior libertação dos compostos da matriz para o espaço de cabeça, melhorando assim as condições de extracção. Contudo a absorção/adsorção dos analitos pelo revestimento da fibra pode ser adversamente afectada devido à diminuição dos coeficientes de partição com o aumento da temperatura, o que resulta numa diminuição na quantidade de composto extraído (Demyttenaere *et al.*, 2003). A diminuição na extracção da 2-hexanona aos 80°C e do ácido octanóico a partir dos 60°C com a fibra CAR/PDMS, de todos os compostos excepto o decanoato de etilo e o ácido octanóico com a fibra PDMS/DVB, da 2-hexanona, 2-pentanol e ácido octanóico aos 80°C com a fibra PDMS, reflecte o efeito da temperatura acima descrito.

Comparando os resultados da influência da temperatura de extracção na recuperação relativa dos diferentes compostos, por observação das figuras 3.4 a 3.6, pode-se considerar como temperatura mais adequada para a extracção os 60°C para as fibras CAR/PDMS e PDMS e os 40°C para a fibra PDMS/DVB.

### 3.2.2 Tempo de extracção

A influência do tempo de exposição foi igualmente avaliada para as fibras em estudo (CAR/PDMS, PDMS/DVB e PDMS).

Nas figuras 3.7 a 3.8 representa-se o sinal obtido para cada um dos compostos em função do tempo de extracção.

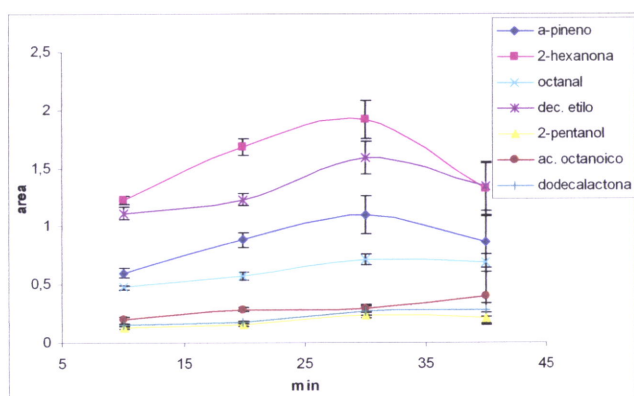


Figura 3.5: Perfil de extração de cada composto (valor médio da área cromatográfica e desvio padrão) ao longo do tempo (10, 20, 30 e 40min) com a fibra CAR/PDMS

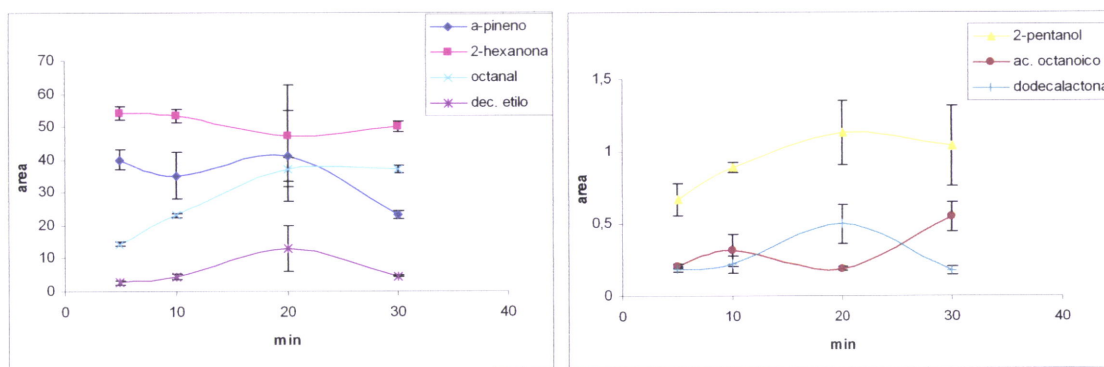


Figura 3.6: Perfil de extração de cada composto (valor médio da área cromatográfica e desvio padrão) ao longo do tempo (5, 10, 20 e 30min) com a fibra PDMS/DVB

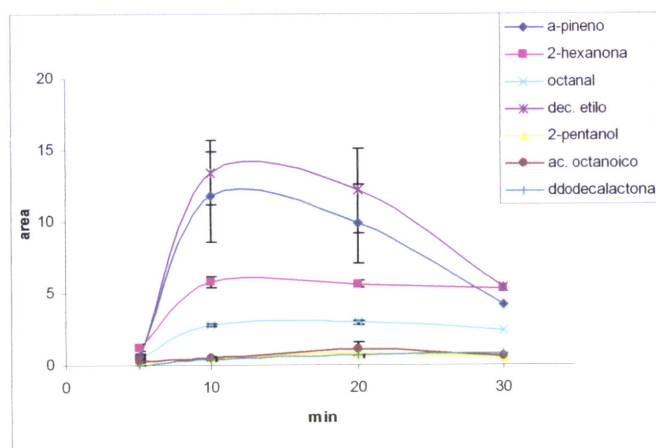


Figura 3.7: Perfil de extração de cada composto (valor médio da área cromatográfica e desvio padrão) ao longo do tempo (5, 10, 20 e 30min) com a fibra PDMS



O mecanismo do SPME baseia-se no equilíbrio da concentração dos analitos na matriz, no espaço de cabeça e na fase estacionária da fibra, o tempo óptimo da extracção deve corresponder ao tempo de equilíbrio. Embora a extracção possa ser efectuada em pré equilíbrio, se for efectuada na fase de equilíbrio serão minimizados os erros experimentais (Supelco, 1998). O tempo de equilíbrio é atingido quando um aumento no tempo de extracção não resulta num aumento significativo da resposta do detector.

Para a fibra CAR/PDMS é observado um aumento da recuperação dos compostos até aos 30 minutos de extracção, fase após a qual a quantidade de composto extraído estabiliza ou até mesmo decresce, exceptuando apenas o caso do ácido octanóico em que é observado ainda um aumento na área cromatográfica aos 40 minutos.

Com a fibra PDMS/DVB é atingido um máximo na eficiência da extracção do  $\alpha$ -pineno, 2-pentanol, octanal, ácido octanóico, e  $\delta$ -dodecalactona aos 20 minutos. A resposta ao longo do tempo da 2-hexanona e do decanoato de etilo é variável com um decréscimo na quantidade de composto extraído ao fim de 20 minutos de extracção.

Na extracção com a fibra PDMS é observado para todos os compostos excepto para o  $\alpha$ -pineno e decanoato de etilo, um aumento na recuperação dos compostos dos 5 para os 10 minutos de extracção período em que aparentemente é atingida a fase de equilíbrio.

O tempo de extracção foi fixado aos 30min para a fibra CAR/PDMS e aos 20min para as fibras PDMS/DVB e PDMS.

### 3.2.3 Factores de Resposta e Linearidade

Com cada uma das fibras, foram efectuadas extracções a uma série de cinco misturas (M1-M5) com concentração dos padrões na gama de 0,3 a 25mg/Kg.

Determinaram-se os factores de resposta absolutos, considerados como o declive da regressão linear obtida para a resposta do detector (área cromatográfica) em função da concentração de cada composto (regressão linear no Anexo II).

Para avaliação da linearidade da resposta foi apreciado o valor do coeficiente de correlação  $r^2$  obtido.

**Tabela 3.1:** Factor de resposta absoluto (FR) e valor de  $r^2$  da regressão linear dos compostos extraídos das misturas M1-M5 com as fibras CAR/PDMS e PDMS/DVB

	CAR/PDMS		PDMS/DVB		PDMS	
	FR	$r^2$	FR	$r^2$	FR	$r^2$
$\alpha$ -pineno	0,0330	0,8462	0,8223	0,9484	0,0140	0,9504
2-hexanona	0,0548	0,8091	2,5194	0,8922	0,0503*	0,9775*
2-pentanol	0,0079	0,8302	0,1645	0,9449	0,0011*	0,9624*
octanal	0,0128	0,7224	1,676	0,9995	0,0309	0,9534
decanoato de etilo	0,0168	0,3855	0,3594	0,9628	0,0194*	0,7888*
ácido octanoico	0,0089	0,7595	0,0146	0,9597	**	**
$\delta$ -dodecalactona	0,0019	0,451	0,0011	0,1992	**	**

\*resultados apenas de M1 a M3 (pois a extracção de M4 e M5 não permitiu a detecção de picos no cromatograma)

\*\* não foram detectados no cromatograma

A análise do comportamento das fibras na extracção dos compostos presentes na mistura usada como modelo permitiu constatar algumas diferenças na obtenção dos resultados.

Como seria de esperar as fases estacionárias mistas permitiram a detecção de todos os compostos e produziram na maioria dos casos intensidades de sinal mais elevadas, sendo a excepção mais evidente o factor de resposta do octanal que é ligeiramente superior na extracção com a fibra PDMS quando comparado com o valor obtido com a fibra CAR/PDMS. A natureza bipolar das fibras PDMS/DVB e CAR/PDMS torna-as mais abrangentes em termos do tipo de compostos que permitem extrair, a capacidade de retenção dos compostos é aumentada devido ao efeito potenciador da adsorção fornecido pelos revestimentos porosos DVB e CAR (Supelco 2001a; Pinho *et al.*, 2003). A fibra PDMS, tal como noutros trabalhos (Pinho *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2004) foi a

que apresentou menor sensibilidade já que não possibilitou a detecção dos compostos nas duas misturas de concentração mais baixa M4 e M5 (Tabela 3.1).

No intervalo de concentração usado foram obtidas respostas superiores com a fibra PDMS/DVB para todos os compostos, excepto para a  $\delta$ -dodecalactona, em que o factor de resposta absoluto é ligeiramente superior para a fibra CAR/PDMS (Tabela 3.1).

Das três fibras usadas para a extracção dos compostos na mistura modelo, a fibra PDMS/DVB foi a que apresentou maior capacidade de extracção. No entanto é observada uma grande diferença entre os factores de resposta obtidos com esta fibra para cada um dos compostos, sendo obtidos valores superiores para a 2-hexanona (2,5194) e para o octanal (1,676) e bastante menores para o ácido octanóico (0,0146) e em especial para a  $\delta$ -dodecalactona (0,0011).

Pretendeu-se avaliar se um eventual efeito de matriz ou a competição entre os diferentes compostos para os locais de adsorção na fibra seria responsável pelos valores reduzidos dos factores de resposta obtidos para a extracção do ácido octanóico e da  $\delta$ -dodecalactona. A questão foi abordada efectuando a extracção de 3 misturas contendo cada um destes compostos isolados na matriz; os factores de resposta absolutos obtidos desta forma foram 0,0092 para o ácido octanóico e 0,0001 para a  $\delta$ -dodecalactona. Pode-se considerar que os valores apresentam uma ordem de grandeza próxima daqueles obtidos na extracção da mistura contendo os restantes compostos, sendo assim rejeitada a hipótese de competição entre estes e os restantes compostos usados como padrão durante a extracção. A baixa sensibilidade apresentada na extracção de ambos os compostos com a fibra PDMS/DVB pode resultar de uma fraca afinidade desta fibra para os referidos compostos ou, por outro lado, estar relacionada com uma pressão de vapor demasiado reduzida destes compostos no espaço de cabeça da mistura. Esta última hipótese pode, por sua vez, resultar da menor volatilidade do ácido octanóico e da  $\delta$ -dodecalactona (ver Tabela 2.1) ou de um efeito de matriz. A própria matriz poderá apresentar propriedades de adsorção (Baltussen *et al.*, 2002), dificultado assim a difusão dos compostos para o espaço de cabeça.

A linearidade da resposta das fibras testadas em função da concentração foi avaliada com base no valor de  $r^2$  da regressão linear da resposta do detector para o composto em função da sua concentração, também para a linearidade da resposta temos valores de  $r^2$  superiores para a fibra PDMS/DVB. Não pode ser associado um comportamento de extracção linear com nenhuma das fibras para a  $\delta$ -dodecalactona, nem para o decanoato de etilo com a fibra CAR/PDMS.

As relações lineares obtidas descrevem a diferença no comportamento de extracção com as diferentes fibras, contudo não se pretende considerá-las válidas para a quantificação directa destes compostos nas amostras.

Embora noutros trabalhos a fibra CAR/PDMS seja considerada como a mais adequada para a extracção de voláteis no queijo (Pinho *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2004), os resultados mais satisfatórios foram obtidos com a fibra PDMS/DVB que demonstrou uma maior eficiência de extracção, indicando assim que esta permitirá executar com maior sucesso a extracção dos voláteis das amostras de queijo.

### **3.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS NO QUEIJO DE ÉVORA**

#### **3.3.1 Identificação dos compostos voláteis extraídos do queijo**

A extracção com a fibra PDMS/DVB seguida da separação cromatográfica permitiu encontrar 20 compostos voláteis no queijo de Évora (Figura 3.8). A identificação dos compostos foi efectuada através da separação e detecção por GC-MS (Tabela 3.2).

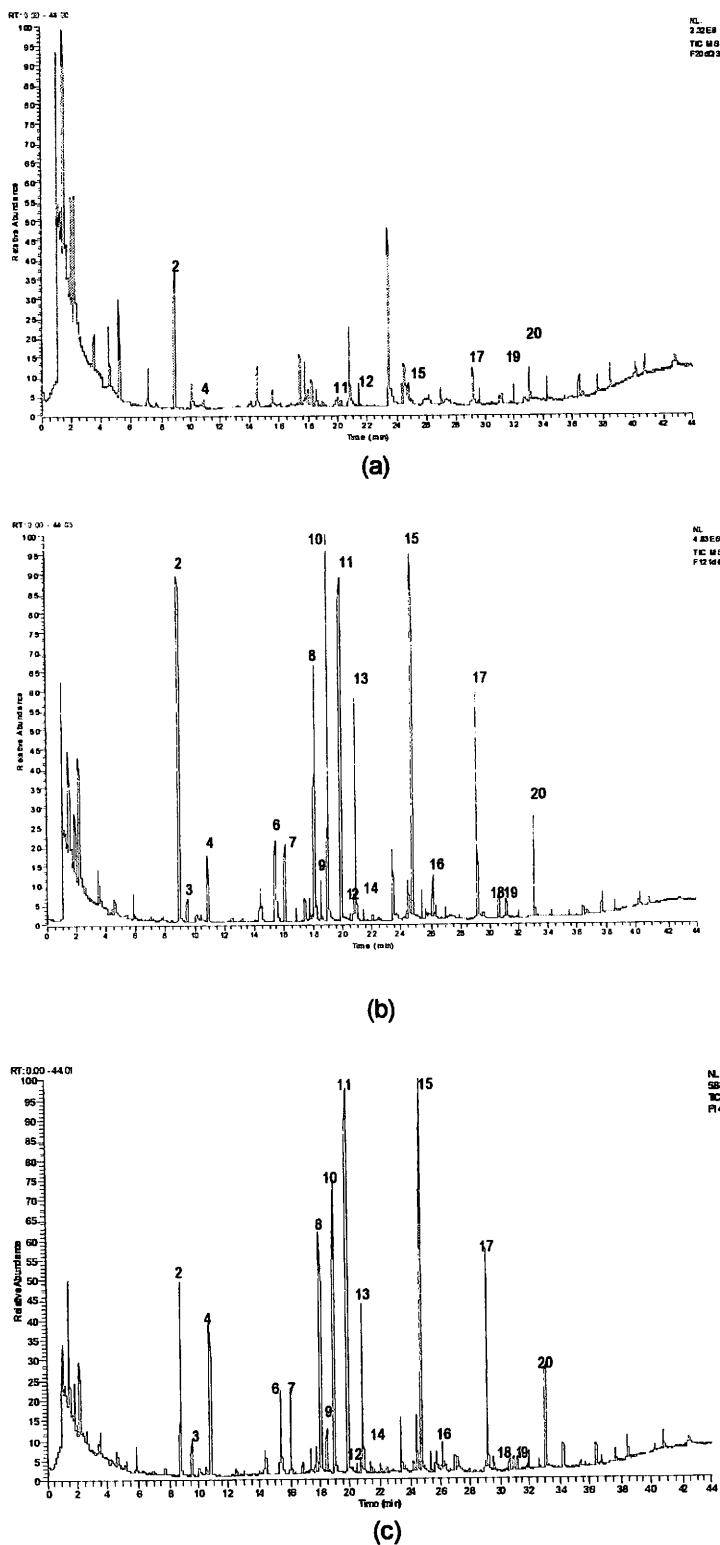


Figura 3.8: Perfil GC-MS dos compostos voláteis extraídos com a fibra PDMS/DVB de um queijo com 0(a), 21(b) e 42(c) dias de maturação. Condições cromatográficas descritas em *Material e Métodos* no ponto 2.3.2

O 2-pentanol, hexanoato de etilo, octanal, 2,3 butanediol (separação de dois isómeros, denominados isómero 1 e isómero 2), ácido butanóico, decanoato de etilo, ácido isovalérico, ácido octanóico, feniletanol, ácido decanóico, ácido acético e ácido isobutírico foram identificados por comparação do espectro de massa e tempo de retenção dos respectivos padrão:

A identificação do 3-metilbutanol, acetoina, 2,5-dimetil-3-hexanol, ácido 2,4-hexadienóico, ácido hexanóico e ácido nonanóico foi efectuada recorrendo à comparação dos espectros de massa obtidos com a biblioteca de espectros de massa NIST versão 2.0 (1998). Recorreu-se ainda à ionização química e ao MS/MS para obtenção de informação adicional.

Dos restantes picos nos cromatogramas é ainda considerado um composto adicional, cujo espectro de massa evidencia tratar-se de um composto orgânico ao contrário de outros picos cromatográficos que surgem da presença de siloxanos. O espectro de massa obtido para este composto quando comparado com os da biblioteca sugere tratar-se do butirato ou isobutirato de etilo, contudo esta hipótese foi rejeitada com base no tempo de retenção apresentado. A presença no espectro *full scan* dos iões com  $m/z=73$  e  $m/z=88$  que correspondem aos fragmentos resultantes do rearranjo de McLafferty de ésteres etílicos permite supor que se trate assim de um éster etílico e considerando o tempo de retenção poderá ser eventualmente o dodecanoato de etilo, contudo na Tabela 3.2 é referenciado como *não identificado*.

**Tabela 3.2:** Identificação dos compostos voláteis no queijo de Évora: número do pico no cromatograma, identificação a partir da comparação com padrões, comparação com espectros de massa das bibliotecas (MS NIST, Wiley), obtenção de informação adicional por análise de espectro CI (CI identificação M+1<sup>+</sup>) e espectros MS/MS (MS/MS informação estrutural)

composto	número	comparação com padrão	IDENTIFICAÇÃO		
			MS NIST 2.0	CI identificação M+1 <sup>+</sup>	MS/MS informação estrutural
2-pentanol	1	+			
3-metilbutanol	2	-	+	+	-
hexanoato de etilo	3	+			
acetoína	4	-	+	+	+
octanal	5	+			
ácido acético	6	+			
2,5-dimetil-3-hexanol	7	-	+	+	-
2,3-butanediol (isómero1)	8	+			
ácido isobutírico	9	+			
2,3-butanediol (isómero2)	10	+			
ácido butanóico	11	+			
decanoato de etilo	12	+			
ácido isovalérico	13	+			
não-identificado	14	-	-		-
ácido hexanóico	15	-	+		
feniletanol	16	+			
ácido octanóico	17	+			
ácido 2,4hexadienóico	18	-	+	-	+
ácido nonanóico	19	-	+	-	-
ácido decanóico	20	+			

+ informação presente; - informação ausente

O número de compostos voláteis encontrados, quando comparado com os voláteis registados em outros queijos produzidos a partir de leite de ovelha cru (Pinho *et al.*, 2004, Fernández-Garcia *et al.*, 2004, Barron *et al.*, 2005) e também no queijo de Évora extraídos por SDE (Pinheiro, 2001) é considerado extremamente reduzido. Esta é uma consequência provavelmente decorrente da metodologia usada, pois a análise de voláteis efectuada por técnicas diferentes pode levar à obtenção de resultados qualitativos e quantitativos diferentes (Jele, H., 2003), o que também se reflecte na extracção por SPME com fibras diferentes (Freitas *et al.*, 2001).

No entanto comparando ainda os compostos voláteis encontrados noutros trabalhos (Pinho *et al.*, 2004, Fernández-Garcia *et al.*, 2004, Costa *et al.*, 2004) com os compostos que são aqui detectados no queijo de Évora verifica-se que estes

correspondem aos menos voláteis. Isto sugere que com este delineamento experimental não foi possível detectar os compostos mais voláteis que eventualmente estão presentes. De facto, um dos componentes da fase estacionária da fibra, o DVB é um revestimento adsorptivo de poros largos (>150 amu) considerado o mais adequado para a extracção e libertação de analitos de grandes dimensões (Supelco 2000). No início do processo de extracção pode até ocorrer a ligação dos compostos de menor massa molecular e também mais voláteis presentes no espaço de cabeça, mas dada a natureza da fase estacionária estes compostos podem ser deslocados por outros com maior afinidade para a fibra ao longo do tempo de extracção (Freitas *et al.*, 2001). Estes últimos são os compostos que são inseridos no injectador e detectados após a separação cromatográfica.

Este fenómeno pode ser reforçado se for observado comportamento da extracção com a fibra PDMS/DVB dos compostos da mistura modelo ao longo do tempo (Figura 3.6). Verifica-se que enquanto a concentração na fibra de compostos como o octanal aumenta e atinge o equilíbrio, a cinética da extracção de outros compostos como o  $\alpha$ -pineno e a 2-hexanona não descrevem este perfil, sendo a concentração superior com um menor tempo de extracção e diminuindo a da 2-hexanona bastante entre os 20 e os 30 minutos de extracção. Esta apreciação indica que também na extracção do espaço de cabeça do queijo pode haver um decréscimo na quantidade extraída pela fibra de determinados compostos ao longo do tempo, nomeadamente os de menor dimensão e mais voláteis.

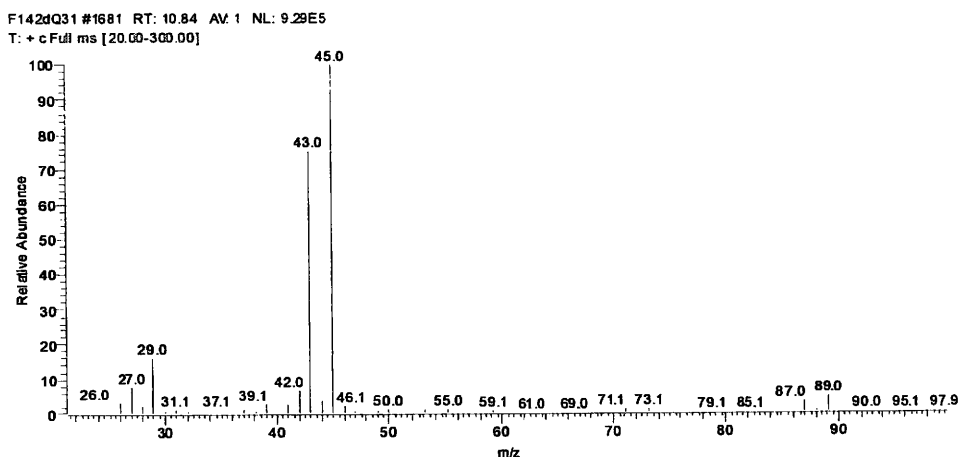
Outro factor que pode também ter contribuído para a obtenção de um número menor que o esperado de compostos voláteis é a adição de um agente antifúngico durante a cura dos queijos. A maturação do queijo de Évora está associada ao metabolismo de bolores (Pinheiro, 2001) aos quais são associados os sistemas enzimáticos que degradam os lípidos e ácidos gordos livres (Alewijn *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2003), pode assim ser levantada a questão se ao afectar o desenvolvimento de determinados microorganismos não será desfavorecida a conversão dos ácidos gordos livres noutros compostos, como por exemplo ésteres e metil-cetonas.



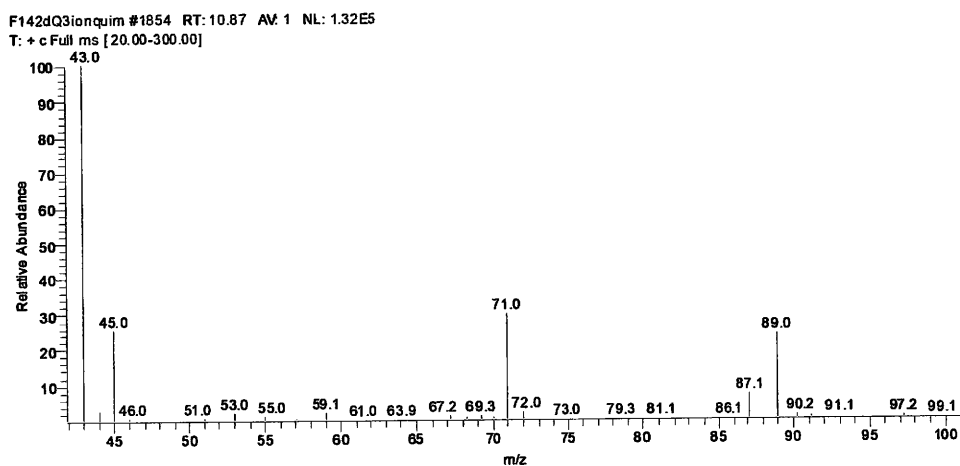
### 3.3.1.1 Interpretação de espectros de massa

A comparação em termos de sensibilidade entre os modos de ionização EI e CI depende do gás reagente e do analito em causa, de qualquer forma quando as análises são realizadas no modo *full scan* o EI é na maioria dos casos mais sensível (Bouchonnet *et al.*, 2004). A CI permitiu a obtenção de espectros de massa com menor fragmentação e onde foi possível detectar a presença do ião  $M+1^+$ . A análise complementar do espectro de massa obtido por CI permitiu determinar a massa molecular a partir do ião  $M+1^+$  do 3-metilbutanol, da acetoina, do 2,5 dimetil-3-hexanol e do ácido hexanóico, tornando a sua identificação menos ambígua.

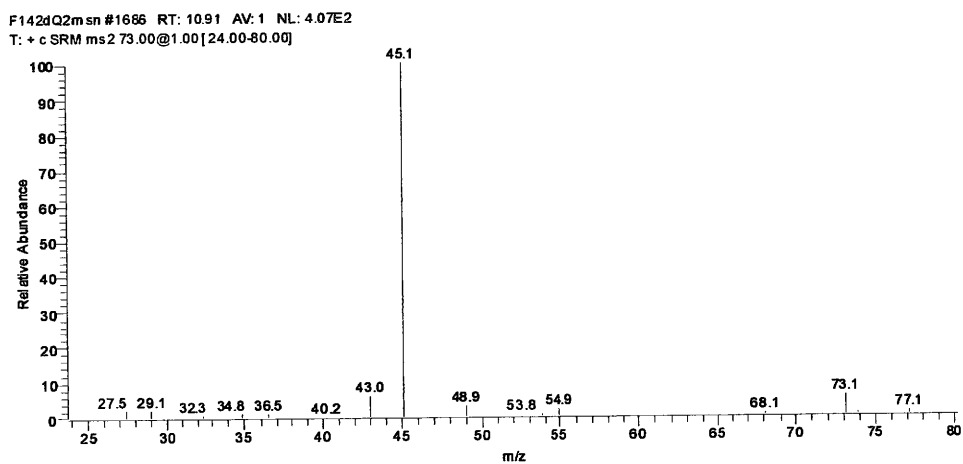
A comparação do espectro de massa obtido por EI (Figura 3.9a) com o obtido por CI (Figura 3.9b) para a acetoina permite observar algumas diferenças. Na ionização por EI a molécula é fragmentada nos iões com  $m/z=43$  e  $m/z=45$ , estando o ião molecular ausente, com a CI formam-se também os fragmentos  $m/z=43$  e  $m/z=45$  (Figura 3.10a) e ainda o fragmento  $m/z=71$  que poderá corresponder à perda de  $^{\circ}\text{OH}$ . No espectro de CI observa-se o ião  $m/z=89$  que corresponde ao ião  $M+1^+$ , o pico  $m/z=72$  poderá eventualmente corresponder a um ião derivado da adição de  $^{\circ}\text{C}_2\text{H}_5$  ao fragmento com massa 43. O espectro MS/MS do fragmento 73 (Figura 3.9c) revela novamente a presença do fragmento com  $m/z=45$  (Figura 3.10b).



(a)



(b)



(c)

Figura 3.9: Espectro de massa da acetoina obtido por EI a 70eV full scan (a), por CI com CH<sub>4</sub> a um fluxo de 0,5mL/min (b) e MS/MS com q= 0,30 do fragmento m/z=73 (c).

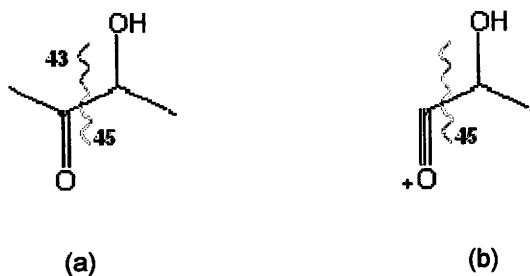
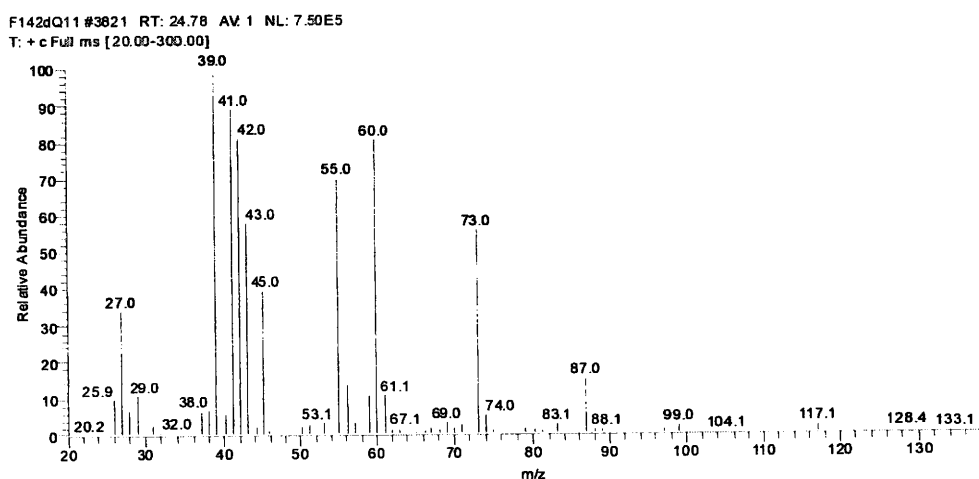
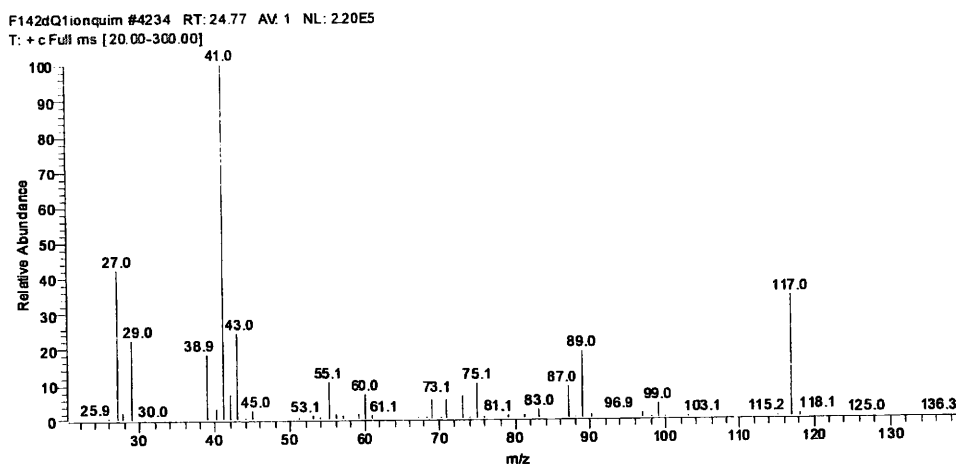


Figura 3.10: Fragmentação possível da acetoina (a) e do fragmento m/z=73 (b)

A observação do espectro de massa do ácido hexanóico obtido por EI (Figura 3.11a) permite verificar a presença do fragmento com  $m/z=60$  correspondente ao ião formado pelo rearranjo de McLafferty dos ácidos carboxílicos, os iões com  $m/z=87$  e  $m/z=73$  resultam de clivagens alió na molécula com a perda respectivamente de  $^{\bullet}C_2H_5$  e  $^{\bullet}C_3H_7$ , neste espectro o ião molecular está ausente. No espectro obtido por CI (Figura 3.11b) é observada menor fragmentação da molécula e é evidente o ião  $M+1^+$  com  $m/z=117$ .



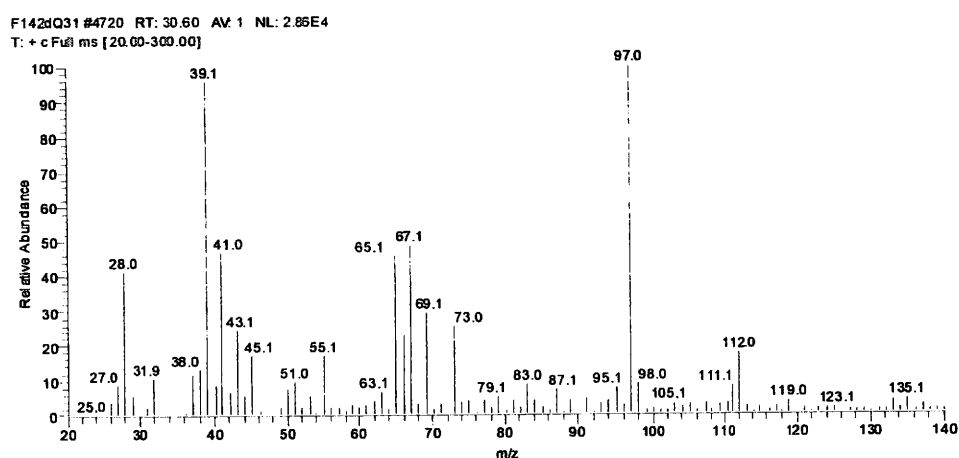
(a)



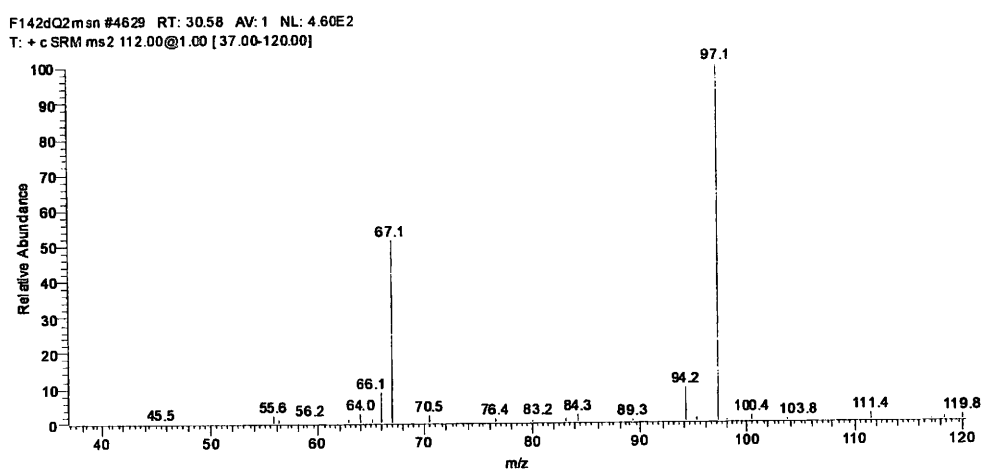
(b)

Figura 3.11: Espectro de massa do ácido hexanóico obtido por EI a 70eV *full scan* (a) e por CI com  $CH_4$  a um fluxo de 0,5mL/min (b)

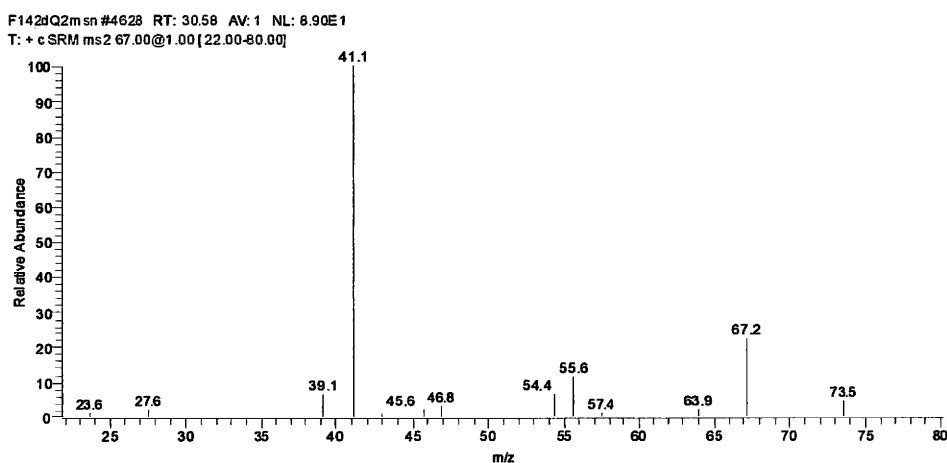
Não foi possível obter um espectro usando a CI do ácido 2,4-hexadienóico, o que está provavelmente relacionado com a menor sensibilidade deste modo de ionização já que o composto se encontra em concentrações reduzidas. No entanto é possível observar no espectro MS/MS (energia média) do ião molecular ( $m/z=112$ ) (Figura 3.12b) a fragmentação nos iões com  $m/z=67$  e com  $m/z=97$ , o pico  $m/z=97$  poderá corresponder à perda do grupo metilo, e o pico  $m/z=67$  poderá corresponder à perda do grupo carboxilo (Figura 3.13a); o espectro MS/MS do fragmento com  $m/z=67$  (Figura 3.12c) apresenta o pico  $m/z=41$  como o mais abundante que pode ser resultante da fragmentação apresentada na figura 3.13 (b).



(a)



(b)



(c)

Figura 3.12: Espectro de massa do ácido 2,4-hexadienóico obtido por EI a 70eV *full scan* (a) e MS/MS com  $q=0,30$  do ião molecular  $m/z = 112$  (b) e do fragmento  $m/z=67$  (c).

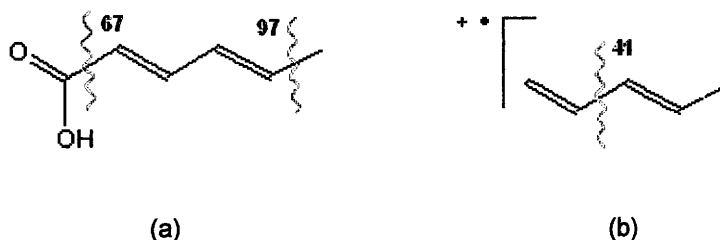


Figura 3.13: Fragmentação possível do ácido 2,4-hexadienóico (a) e do fragmento  $m/z=67$  (b)

### 3.3.2 Variação dos compostos voláteis ao longo da maturação

Na seguinte tabela apresentam-se os valores médios e o resultado da análise e comparação de médias usando o teste de Tuckey com um nível de significância de 95% de cada um dos compostos nas três fases de maturação estudadas, a quantidade de cada composto foi considerada em unidades arbitrárias, sendo correspondente ao valor da área do pico cromatográfico.

**Tabela 3.3:** Compostos voláteis no queijo de Évora em três fases da maturação (0, 21 e 42 dias). Valores médios em unidades arbitrárias (área do pico); médias seguidas de letras idênticas na mesma linha não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) devido ao efeito fase da maturação

composto	fase de maturação (dias)		
	0 (n=18)	21 (n=18)	42 (n=18)
ácido acético	0 <sup>a</sup>	7,2125 <sup>b</sup>	10,8988 <sup>c</sup>
ácido isobutírico	0 <sup>a</sup>	0,7178 <sup>b</sup>	0,6821 <sup>b</sup>
ácido butanóico	0,0392 <sup>a</sup>	16,5276 <sup>b</sup>	25,0904 <sup>c</sup>
ácido isovalérico	0 <sup>a</sup>	4,3317 <sup>b</sup>	4,2346 <sup>b</sup>
ácido hexanóico	0,282 <sup>a</sup>	11,8211 <sup>b</sup>	15,4386 <sup>c</sup>
ácido octanóico	0,5204 <sup>a</sup>	4,6841 <sup>b</sup>	5,8481 <sup>c</sup>
ácido 2,4hexadienóico	0,0319 <sup>a</sup>	0,7519 <sup>b</sup>	0,5866 <sup>c</sup>
ácido nonanóico	0,113 <sup>a</sup>	0,1709 <sup>a</sup>	0,1921 <sup>a</sup>
ácido decanóico	0,4962 <sup>a</sup>	1,7744 <sup>b</sup>	2,4706 <sup>c</sup>
hexanoato de etilo	0 <sup>a</sup>	1,2625 <sup>b</sup>	3,0219 <sup>c</sup>
decanoato de etilo	0,6656 <sup>a</sup>	0,2619 <sup>b</sup>	0,2347 <sup>b</sup>
2-pentanol	0 <sup>a</sup>	0,0113 <sup>a</sup>	0,1437 <sup>b</sup>
3-metilbutanol	3,0579 <sup>a</sup>	10,0779 <sup>b</sup>	6,9018 <sup>c</sup>
2,5-dimetil-3-hexanol	0,0124 <sup>a</sup>	0,9606 <sup>b</sup>	1,1979 <sup>c</sup>
2,3-butanediol	0 <sup>a</sup>	9,1121 <sup>b</sup>	14,2296 <sup>c</sup>
2,3-butanediol(IS)	0,0235 <sup>a</sup>	15,8262 <sup>b</sup>	18,0495 <sup>b</sup>
feniletanol	0 <sup>a</sup>	0,6979 <sup>b</sup>	0,5313 <sup>c</sup>
octanal	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,1013 <sup>b</sup>
acetoina	0,6146 <sup>a</sup>	2,3368 <sup>b</sup>	5,0456 <sup>c</sup>
não-identificado	0 <sup>a</sup>	0,0963 <sup>b</sup>	0,1485 <sup>c</sup>

Os resultados da análise de variância apresenta-se no ANEXO IV.

### 3.3.2.1 Ácidos Gordos

Os ácidos gordos livres são componentes marcantes no aroma de determinados tipos de queijo e o seu papel já foi revelado como importante no queijo de Évora (Pinheiro, 2001). Dos compostos voláteis encontrados, os ácidos gordos foram os maioritários (Tabela 3.3), tanto em número de compostos desta classe química, como em quantidade de composto presente.

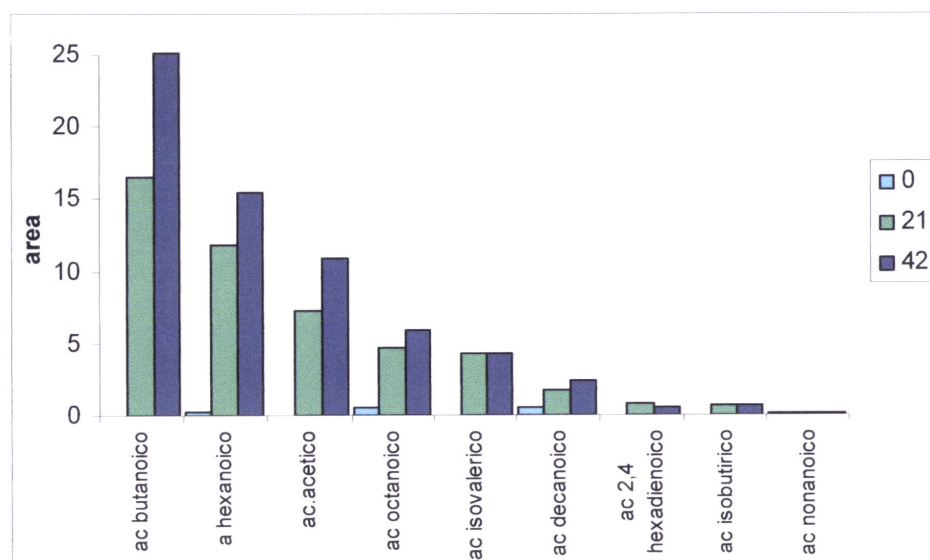
Como já mencionado por Pinheiro (2001) a elevada quantidade de ácidos gordos livres encontrados no queijo de Évora indicam que este queijo é caracterizado por uma elevada taxa de lipólise. Dentro da classe dos ácidos gordos, os maioritários foram o ácido butanóico e o ácido hexanóico, que são caracterizados por notas pungentes e a ranço fortes (Frank *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2005; Horne *et al.*, 2005), e também o ácido acético, que apresenta limites de percepção muito variáveis (Nogueira *et al.*, 2005) e um odor típico de vinagre (Curioni & Bosset, 2002).

Ao longo da maturação foram observadas variações na concentração dos diferentes ácidos carboxílicos, havendo um aumento da concentração ( $p < 0,001$ ) de ácido acético, butanóico, hexanóico, octanóico, 2,4 hexadienóico e decanóico entre as três fase de maturação (0, 21 e 42 dias). A concentração de ácido nonanóico não variou ao longo das fases de maturação dos queijos analisados.

O ácido acético é produzido por diferentes processos, que incluem a oxidação da lactose por bactérias lácticas em condições anaeróbias e o catabolismo (desaminação e descarboxilação oxidativa) da alanina e da serina também por acção de bactérias lácticas (Ziino *et al.*, 2005).

O ácido hexanóico, tal como os restantes ácidos gordos lineares, resulta essencialmente da degradação dos lípidos do leite; já para a produção do ácido butanóico são responsáveis além dos processos lipolíticos, também a fermentação da glucose (proveniente da hidrólise da lactose) e do lactato e a degradação de aminoácidos (Nogueira *et al.*, 2005).

Na Figura 3.14 representa-se a variação na concentração de ácidos gordos identificados ao longo da maturação do queijo.



**Figura 3.14:** Efeito da maturação (0, 21 e 42 dias) na quantidade de ácidos gordos

Também os ácidos gordos ramificados são compostos com impacto no aroma característico do queijo de ovelha. O ácido isovalérico que é provavelmente derivado da leucina, contribui para um aroma do queijo muito curado com odores a ranço, doce e pútrido; ao ácido isobutírico é dada a descrição ranço e manteiga (Curioni & Bosset, 2002). Tanto a concentração do ácido isobutírico, como do isovalérico aumentou significativamente ( $p < 0,001$ ) apenas entre a primeira (0 dias) e a segunda (21 dias) fase de maturação do queijo.

### 3.3.2.2 Outros Compostos Voláteis

Na Figura 3.15 representa-se a variação na concentração dos restantes compostos voláteis ao longo da maturação do queijo de Évora.



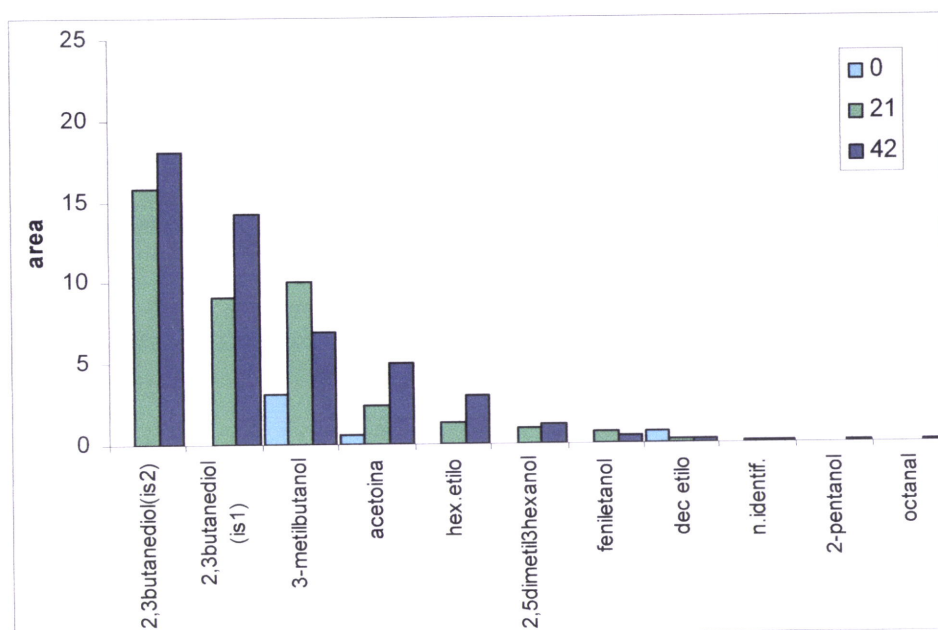


Figura 3.15: Efeito da maturação (0, 21 e 42 dias) na quantidade de compostos voláteis

Os ésteres são constituintes comuns da fracção volátil do queijo, sendo concentrações elevadas de butanoato de etilo registadas nos queijos Gruyère e Parmigiano aos quais são associados aromas frutados e florais (Engels *et al.*, 1997; Curioni & Bosset, 2002). Os ésteres são muito voláteis à temperatura ambiente e apresentam um baixo limite de percepção, podem assim desempenhar um papel chave no aroma mesmo quando presentes em quantidades reduzidas.

Nos queijos analisados foram encontrados o hexanoato de etilo e o decanoato de etilo. Para o hexanoato etilo foi observado um aumento significativo da sua concentração ( $p < 0,001$ ) ao longo da maturação, comportamento também apresentado pelo composto não identificado. A concentração do decanoato de etilo diminuiu ( $p < 0,001$ ) entre os 0 e os 21 dias de maturação, não sendo observada uma diferença significativa entre os 21 e os 42 dias de maturação.

Muitas vias metabólicas estão envolvidas na biossíntese dos álcoois que são encontrados no queijo, tais como o metabolismo da lactose, a redução de metilcetonas, metabolismo de aminoácidos e também de ácidos gordos. (Curioni & Bosset, 2002).

A classe dos álcoois é quantitativamente a principal na fracção volátil dos queijos Castellano, Manchego e La Serena (Fernández-García *et al.*, 2004a).

Nos queijos analisados foi encontrado o 2,3 butanediol (vários isómeros) como um dos compostos voláteis maioritários. Este composto surge da metabolização do piruvato, que por sua vez é produto do catabolismo do citrato e da lactose por lactococci citrato-positivas (McSweeney & Sousa, 2000). A variação da concentração do primeiro isómero ao longo da fase foi significativa ( $p < 0,001$ ), para o segundo isómero observou-se também um aumento da concentração ao longo da fase que é no entanto estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) apenas entre os 0 e 21 dias de cura.

A presença de álcoois metilados que podem surgir por acção de estirpes da espécie *Lactococcus lactis* (Morales *et al.*, 2003), resulta do metabolismo de aminoácidos ramificados (Nogueira *et al.*, 2005), o 3-metilbutanol surge da redução do correspondente aldeído, que por sua vez é derivado da leucina. Considera-se que este composto tem um contributo importante no aroma global do queijo, sendo atribuído ao 3-metilbutanol um aroma agradável, ligeiramente adoçado e fresco (Curioni & Bosset, 2002; Nogueira *et al.*, 2005; Fernández-García *et al.*, 2004). No grupo dos álcoois, o 3-metilbutanol foi também maioritário, a sua concentração variou significativamente ( $p < 0,001$ ) entre as três fases da maturação, havendo um aumento da sua concentração dos 0 para os 21 dias de cura e uma subsequente redução até aos 42 dias de cura.

Em níveis mais baixos foram detectados o 2,5-dimetil-3-hexanol e o 2-pentanol, o primeiro variou significativamente ( $p < 0,001$ ) entre a primeira e a segunda fase da maturação e também ( $p < 0,01$ ) entre a segunda e a terceira fase. A variação da concentração do 2-pentanol foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre os 21 e os 42 dias de cura.

O álcool aromático feniletanol resulta da degradação de Strecker da fenilalanina (McSweeney & Sousa, 2000), que é na maioria dos casos associada ao metabolismo de leveduras (Curioni & Bosset, 2002), mas ocorre também em algumas estirpes de *Lactococcus Lactis* (Nogueira *et al.*, 2005). O feniletanol é um dos álcoois aromáticos com maior poder odorante (Curioni & Bosset, 2002) fornecendo um aroma agradável

com notas florais em muitos queijos e é um dos compostos maioritários no Camembert (Molimard & Spinnler, 1996). A presença do feniletanol nos queijos analisados aumentou dos 0 para os 21 dias de cura ( $p < 0,001$ ) e em seguida diminuiu ( $p \leq 0,001$ ) até aos 42 dias de cura.

Os aldeídos alifáticos são os produtos maioritários da auto-oxidação de ácidos gordos insaturados e embora este processo seja limitado no queijo devido ao seu baixo potencial *redox* e aos baixos níveis de ácidos gordos insaturados, estes compostos são encontrados em concentrações relativamente elevadas em diferentes tipos de queijo curado caracterizados por uma elevada taxa de lipólise como o Gruyère e o Parmigiano (Engels *et al.*, 1997; Bellesia *et al.*, 2003). Contudo os aldeídos são relativamente instáveis no queijo pois são rapidamente convertidos por redução em álcoois ou por oxidação em ácidos (Fernández-García *et al.*, 2004; Ziino *et al.*, 2005; Curioni & Bosset, 2002). Os aldeídos de cadeia linear são caracterizados por aromas herbáceos e são considerados como desagradáveis quando a sua concentração excede determinados limites; nos queijos analisados foi detectado o octanal apenas nos queijos com 42 dias de maturação.

A 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) surge do metabolismo do citrato e da lactose e é caracterizada por notas a manteiga. A acetoína foi detectada nos queijos em todas as fases de cura, sendo registado um aumento ( $p < 0,01$ ) entre os 0 e 21 dias, e também ( $p < 0,001$ ) entre os 21 e os 42 dias de maturação.

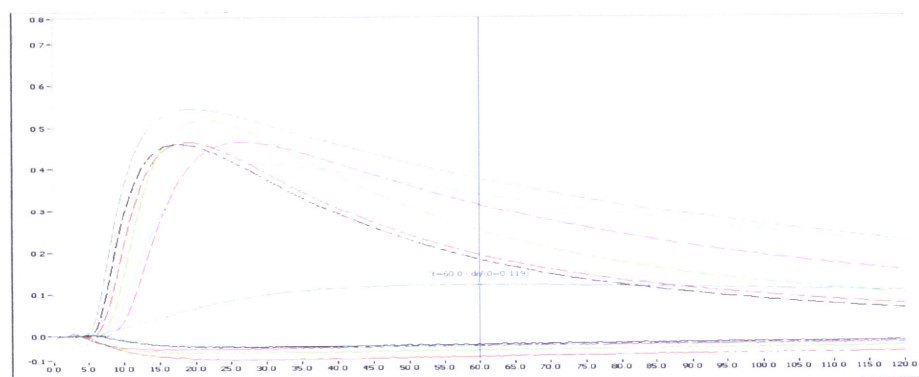
### **3.4 AROMA GLOBAL DO QUEIJO DE ÉVORA**

#### **3.4.1 Aroma global do queijo de Évora ao longo da maturação analisado pelo nariz electrónico**

Embora as tentativas para correlacionar as respostas do EN a atributos sensoriais resultem apenas parcialmente (Aishima, T 2004), a metodologia é actualmente também

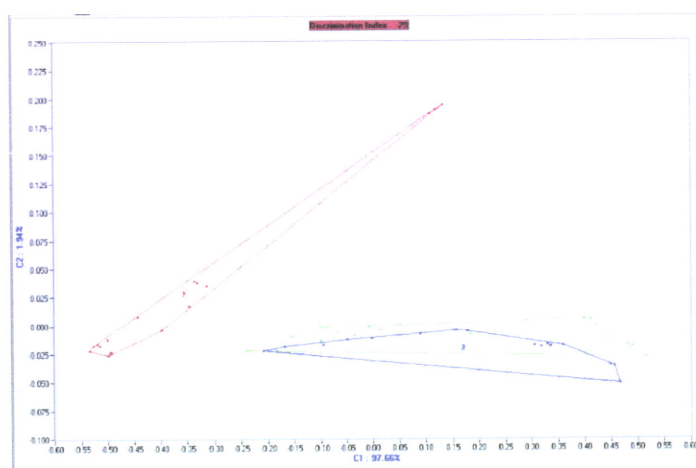
aplicada na avaliação/discriminação das fases de maturação dos queijos através da análise do aroma (Contarini *et al.*, 2001).

Na figura seguinte pode observar-se o padrão de resposta dos sensores obtido da análise do espaço de cabeça, de amostras de queijo de Évora com 42 dias de maturação.



**Figura 3.16:** "Impressão digital" obtida com o *Alpha-Fox 3000* na análise de um queijo com 42 dias de maturação

Na figura 3.17 observa-se o resultado da análise de componentes principais (PCA) para as amostras de queijo obtidas nas três fases de maturação.



**Figura 3.17:** Discriminação das amostras de queijo com 0 (1-vermelho), 21 (2-azul) e 42 (3-verde) dias de maturação obtida pela PCA efectuada pelo software *AlphaSoft*

A análise da Figura 3.17 permite verificar uma diferenciação entre as amostras da primeira fase da maturação, das duas fases restantes. De acordo com a PCA, 97,66%

da variação observada é explicada pela primeira componente (C1), sendo 1,94% da variação explicada pela segunda componente (C2). Nesta análise obteve-se um índice total de discriminação de -29, o valor negativo deve-se à sobreposição das representações das amostras de 21 e 42 dias de maturação.

Os resultados observados sugerem que o aroma global do queijo difere de forma mais acentuada entre os 0 e 21 dias de maturação, fase após a qual a distinção com o EN nas condições usadas já não é possível.

Dos 20 compostos voláteis encontrados no queijo de Évora, 9 surgem apenas na segunda fase da maturação, é evidente que entre os 0 e 21 dias de cura ocorre um aumento na complexidade do aroma resultante da presença de uma maior diversidade de compostos voláteis. Entre os 21 e 42 dias de maturação a análise dos compostos voláteis permitiu apenas detectar diferenças quantitativas entre as duas fases, aparentemente estas diferenças não têm um impacto tão marcado no aroma global detectado pelo EN. Contudo para uma avaliação completa do aroma dos queijos estudados, este trabalho deveria ser complementado com uma análise sensorial.

## 4. CONCLUSÃO

O estudo das fibras CAR/PDMS, PDMS/DVB e PDMS, usando a mistura modelo permitiu verificar as divergências na extracção com as diferentes fibras. Nas condições usadas, a fibra PDMS/DVB aparentou ser o revestimento com as melhores características quanto à eficiência e linearidade da resposta na extracção dos compostos voláteis presentes.

Com a fibra seleccionada para a análise dos queijos (PDMS/DVB) foi possível efectuar a extracção de 20 compostos voláteis, este é um número inferior ao esperado. Provavelmente não foram detectados os compostos mais voláteis eventualmente presentes no espaço de cabeça do queijo, o que, em parte, é uma consequência da natureza da própria fase estacionária que a torna mais adequada para a extracção de analitos com massa molecular superior a 150amu.

A análise por MS confirmou ser uma ferramenta relevante na identificação dos compostos presentes; na ausência de padrões a CI e o MS/MS revelaram-se muito úteis como análise complementar.

O estudo da evolução do perfil de voláteis no queijo ao longo da cura revelou que estes compostos se encontram em menor número na primeira fase, nos queijos com 0 dias foram apenas encontrados um parte (11 compostos) de todos os compostos extraídos nos queijos com 21 e 42 dias de maturação. Entre os 0 e os 21 dias de maturação há um aumento da concentração destes compostos e surgem ainda novos componentes na fracção volátil do queijo. Entre os 21 e os 42 dias de maturação é observado um aumento da concentração da maioria dos compostos presentes.

A análise do perfil global com o NE permitiu diferenciar os queijos com 0 dias dos restantes, mas não separou os queijos das outras duas fases. As diferenças qualitativas apresentadas entre a primeira e as restantes duas fases contribuem mais para a separação do perfil global detectado pelo EN, do que as diferenças quantitativas observadas entre os 21 e 42 dias de maturação.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rehim, M, Bielenstein, M., Arvidsson, T. (2000) Evaluation of Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography SPME-GC as a Tool for Quantitative Bioanalysis, *J. Microcolumn Separations* 12 (5), 308-315
- Acosta, R., Snow, N., Tipler, A., Ettre, L. (2004) Measuring the temperature of sample vials during headspace extraction using gas chromatography; *27<sup>th</sup> International Symposium on capillary chromatography*, Riva del Garda, Itália
- Aishima, T (2004) ; Correlating sensory attributes to gas chromatography–mass spectrometry profiles and e-nose responses using partial least squares regression analysis, *J Chromatogr A* 1054, 39-46
- Alewijn, M., Sliwinski, E.L., Wouters, J.T.M. (2005) Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese, *Int. Dairy Journal* 15, 733–740
- Ampuero, S., Bosset, J.O. (2003) The electronic nose applied to dairy products: a review, *Sens. Actuators B* 94, 1–12
- Arthur, C.L., Pawliszyn, J. (1990) Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Anal. Chem.* 62 2145-2148
- Avsar, Y.K., Karagul-Yuceer, Y., Drake, M.A., Singh, T.K., Yoon, Y., Cadwallader, K.R. (2004) Characterization of nutty flavor in cheddar cheese, *J Dairy Sci.* 7, 1999-2010
- Ayad, E.H.E, Awad, S., El Attar, A., de Jong, C., El-Soda, M. (2004) Characterisation of Egyptian Ras cheese. 2. Flavour formation, *Food Chemistry* 86 (4), 553-561
- Baltussen, E., Cramers, C.A., Sandra, P.J.F. (2002) Sorptive sample preparation – a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 3-22
- Barron, L.J.R., Redondo, Y., Flanagan, C.E., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Nájera, A.I., Renobales, M., Fernández-García, E. (2005) Comparison of the volatile composition and sensory characteristics of Spanish PDO cheeses manufactured from ewes' raw milk and animal rennet, *Int. Dairy Journal* 15, 371–382
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2004) Food Chemistry 3<sup>a</sup> Ed., *Springer-Verlag*, Berlim, Alemanha, Cap.5 e 10
- Bellesia, F., Pinetti, A., Pagnoni, U.M., Rinaldi, R., Zucchi, C., Caglioti, L., Palyi, G. (2003) Volatile components of Grana Parmigiano-Reggiano type hard cheese, *Food Chemistry* 83, 55–61
- Berodier, F., Lavanchy, P., Zannoni, M., Casals, J., Herrero, L., Adamo, C. (1997) Guia de avaliação olfacto-gustativa para queijos de pasta dura e semi-dura, *Imprimerie Seigle-*

Ferrand, Poligny, França

- Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., Sgorbini, B. (2004) Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyse the volatile fraction of food matrices, *J. Chromatogr. A* 1024, 217–226
- Boland, A.A.B., Pawliszyn, J. (1996) Solid Phase Microextraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Alkylphenol Ethoxylate Surfactants in Water, *Anal. Chem.* 68, 1521-1529
- Bouchonnet, S., Libong, D., Sablier, M. (2004) Low Pressure Chemical Ionization in Ion Trap Mass Spectrometry, *Eur J Mass Spectrom* 10(4), 509-521
- Bugaud, C., Buchin, S., Hauwuy, A., Coulon, J.-B. (2001) Relationships between flavour and chemical composition of Abondance cheese derived from different types of pastures, *Lait* 81, 757-773
- Chen, Y. (2004) New Calibration Approaches in solid phase microextraction for on-site analysis, *Tese de Doutorado*, Universidade de Waterloo, Ontario, Canada
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003) Review. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge, *Int. Dairy Journal* 13, 841–866
- Costa, R., Chiofalo, B., Chiofalo, L., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L. (2004) SPME-GC/MS: A suitable technique for the analysis of cheese aroma profile; *27<sup>th</sup> International Symposium on capillary chromatography*, Riva del Garda, Itália
- Curioni, P.M.G. & Bosset, J.O. (2002) Review: Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry, *Int. Dairy Journal* 12, 959-984
- Demyttenaere, J.C.R., Dagher, C., Sandra, P., Kallithraka, S., Verhe, R., Kimpe, N. D. (2003) Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction–capillary gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 985, 233–246
- Díaz, P. Ibáñez, E., Señoráns, F.J., Reglero, G. (2003) Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A*, 1017, 207–214
- Dirinck, P. & De Winne, A. (1999), Flavour characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic–mass spectrometric profiling, *J. Chromatogr. A*, 847 (1999) 203–208
- Doleschall, F., Recseg, K., Kemény,Z., Kovári,K. (2003) Comparison of differently coated SPME fibres applied for monitoring volatile substances in vegetable oils *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 333–338
- Engels, W. J. M., Dekker, R., Jong, C., Neeter, R., Visser, S. A. (1997). A comparative study
-



of volatile compounds in the watersoluble fraction of various types of ripened cheese. *Int. Dairy Journal* 7, 255–263

- Fernández-García, E., Carbonell, M., Gaya, P., Nuñez, M. (2004) Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation, *Int. Dairy Journal* 14, 701–711
- Fernández-García, E., Medina, M., Gaya, P., Nuñez, M. (2004) Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation, *Int. Dairy Journal* 14, 39–46
- Frank, D.C., Owen, C.M., Patterson, J. (2004) Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, 139–154
- Freitas, A.M.C., Parreira, C., Vilas-Boas, L. (2001) Comparison of two SPME fibers for differentiation of coffee by analysis of volatile compounds, *Chromatographia* 54 (9-10), 647-652
- Freitas, A.M.C., Parreira, C., Vilas-Boas, L. (2001a) The Use of an Electronic Aroma-sensing Device to Assess Coffee Differentiation. Comparison with SPME Gas Chromatography[Mass Spectrometry Aroma Patterns, *J. Food Composition and Analysis* 14, 513-522
- Freire, L.T.V. (2002) Comparação de dois métodos, SPME e SDE, para a análise quantitativa de compostos do aroma. Aplicação do SPME associado à CG-EM na análise de vinhos monocasta, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Nova de Lisboa
- Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jägers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Stanton, C. (1999) Influence of a Probiotic Adjunct Culture of *Enterococcus faecium* on the Quality of Cheddar Cheese, *J. Agri. Food Chem.* 47 (12), 4907-4916
- Giani, I., Panseri, S., Mentasti, T., Valfré, F., Moretti, V.M. (2004) Determination of aroma compounds in Bitto cheese by Stir Bar Sorptive Extraction – Thermal Desorption Capillary Gas – Chromatography Mass – Spectrometry, Apresentação em Poster, *IDF Symposium "Cheese Ripening, Characterisation and Technology"*, Praga, República Checa
- Gómez-Ruiz, J.A.; Ballesteros, C., Vinas, M.A.G., Cabezas, L., Martínez-Castro, I. (2002) Relationships between volatile compounds and odour in Manchego Cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times, *Lait* 82, 613-628

- Hansen, T.K. & Jakobsen, M. (2001) taxonomical and technological characteristics of *Saccharomyces* spp. Associated with blue veined cheese, *Int. Journal of Food Microbiology* 69, 59-68
- Hayasaka, Y., MacNamara, K., Baldock, G.A., Taylor, R.L., Pollnitz, A.P. (2003) Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 948-955
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (1997) Spectroscopic Methods in Organic Chemistry, *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemanha*, cap.4
- Holland, R., Liu, S.-Q., Crow, V.L., Delabre, M.-L., Lubbers, M., Bennet, M., Norris, G. (2005) Review: Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification, *Int. Dairy Journal* 15, 711-718
- Hook, G.L., Kimm, G.L., Hall, T., Smith, P.A. (2002) Solid-phase microextraction (SPME) for rapid field sampling and analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *Trends in Analytical Chemistry* 21 (8), 534-543
- Horne, J., Carpino, S., Tuminello, L., Rapisarda, T., Corallo, L., Licitra, G. (2005) Differences in volatiles, and chemical, microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese cheeses, *Int. Dairy Journal* 15, 605-617
- Hyotylainen, T., Riekkola, M.-L. (2004) Approaches for on-line coupling of extraction and chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1962-1981
- Jele, H.H. (2003) Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites, *Letters in Applied Microbiology* 36 (5), 263
- Jinno, K., Muramatsu, T., Saito, Y., Kiso, Y., Magdic, S., Pawliszyn, J. (1996) Analysis of pesticides in environmental water samples by solid-phase micro-extraction—high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 754, 137-144
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M.B., Geissler, M., (2002) Analysis of the headspace aroma compounds of the seeds of the Cameroonian “garlic plant” *Hua gabonii* using SPME/GC/FID, SPME/GC/MS and olfactometry, *Eur. Food Res. Technol.* 214, 212-215
- Jublot, L., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J. (2004) Direct coupling of supercritical fluid extraction to a gas phase atmospheric pressure chemical ionisation source ion trap mass spectrometer for fast extraction and analysis of food components, *J. Chromatogr. A*, 1056, 27-33
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Yvon, M. (2003) Cooperation between *Lactococcus lactis* and Nonstarter *Lactobacilli* in the Formation of Cheese aroma from Amino Acids, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2), 734-739

- Krings, U., Banavara, D.S., Berger, R.G., (2003) Thin layer high vacuum distillation to isolate the flavor of high-fat food, *Eur. Food Res. Technol.* 217, 70–73
- Lambropoulou, D. A., Sakkas, V.A., Albanis, T.A. (2002) Validation of an SPME method using PDMS, PA, PDMS–DVB and CW–DVB SPME fiber coatings for analysis of organophosphorus insecticides in natural waters, *Anal. Bioanal. Chem.* 374, 932–941
- Lee, J.-H. Diono, R., Kim, G.-Y., Min, D. B. (2003) Optimization of Solid Phase Microextraction Analysis for the Headspace Volatile Compounds of Parmesan Cheese, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1136–1140
- Lestremau, F., Desauziers, V., Fanlo, J.-L. (2004) Headspace SPME followed by GC/PFPD for the analysis of malodorous sulfur compounds in liquid industrial effluents, *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 190–196
- Liu, M. Zeng, Z., Xiong, B. (2005) Preparation of novel solid-phase microextraction fibers by sol–gel technology for headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aroma compounds in beer, *J. Chromatogr. A* 1065, 287–299
- Madkor, S.A., Tong, P.S., El Soda, M. (2000) Ripening of Cheddar Cheese with Added Attenuated Adjunct Cultures of Lactobacilli, *J. Dairy Sci.* 83, 1684–1691
- Mariaca, R.G., Imhof, M.I., Bosset, J.O. (2001), Occurrence of volatile chiral compounds in dairy products, especially cheese – A review, *Eur. Food Res. Technol.* 212, 253–261
- Marilley, L., Casey, M.G. (2004) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains, *Int. Journal of Food Microbiology* 90, 139–159
- Martinez-Cuesta, M.C., Palencia, P.F., Requena, T., Peláez, C. (2001) Review: Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* IFPL731 for flavour development in cheese, *Int. Dairy Journal* 11, 577–585
- Mazida, M.M., Salleh, M.M., Osman, H. (2005) Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME) *J. Food Composition and Analysis* 18, 427–437
- McSweeney, P.L.H. & Sousa, M.J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review, *Lait* 80, 293–324
- Moldão-Martins, M., Palavra, A., Beirão da Costa, M.L., Bernardo-Gil, M.G. (2000) Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* aroma, *J. Supercritical Fluids* 18, 25–34
- Molimard, P. & Spinnler, H. (1996) Compounds involved in the flavor surface of mold-ripened cheese: origins and properties, *J. Dairy Sci.* 79, 169–184

- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P., Nuñez, M. (2003) Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese, *Int. Dairy Journal* 13, 201–209
- Navarro, T., Lorenzo, C., Perez, R. A. (2004) SPME analysis of volatile compounds from unfermented olives subjected to thermal treatment, *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 812–817
- Ngassoum, M.B., Jirovetz, L., Buchbauer, G. (2001) SPME/GC/MS analysis of headspace aroma compounds of the Cameroonian fruit *Tetrapleura tetraptera* (Thonn.) Taub., *Eur. Food Res. Technol.* 213, 18–21
- Nogueira, M.C.L., Lubachevsky, G., Rankin, S.A. (2005) A study of the volatile composition of Minas cheese, *LWT* 38, 555–563
- Panseri, S., Giani, I., Mentasti, T., Valfré, F., Moretti, V.M. (2004) Isolation of terpenes and aroma compounds in mountain herbs and typical goat cheese by SBSE and TD-GC/MSD, Apresentação em Poster IDF Symposium "Cheese Ripening, Characterisation and Technology", Praga, República Checa
- Partidario, A.M., Barbosa, M., Vilas Boas, L. (1998) Free Fatty Acids, Triglycerides and Volatile Compounds in Serra da Estrela Cheese – Changes throughout Ripening, *Int. Dairy Journal* 8, 873–881
- Pawliszyn, J. (1997) Solid Phase Microextraction Theory and Practice, *Wiley-VCH, Inc.*, Nova Iorque, E.U.A.
- Pérès, C., Viallon, C. Berdagué, J.-L. (2001) Solid-Phase Microextraction-Mass Spectrometry: A New Approach to the Rapid Characterization of Cheeses, *Anal. Chem.* 73, 1030–1036
- Pillonel, L., Altieri, D., Tabacchi, R., Bosset, J.O. (2004) Comparison of efficiency and stability of two preconcentration techniques (SPME and INDEx) coupled to an MS-based "Electronic Nose", *Mitt. Lebensm. Hyg.* 95, 85–98
- Pillonel, L., Badertscher, R., Bütikofer, U., Casey, M., Dalla Torre, M., Lavanchy, P., Meyer, J., Tabacchi, R., Bosset, J.O. (2002) Analytical methods for the determination of the geographic of Emmentaler cheese. Main framework of the project; chemical, biochemical, microbiological, colour and sensory analyses, *Eur. Food Res. Technol.* 215, 260–267
- Pinheiro, C.M. (2001) Contributo para a caracterização do queijo de ovelha produzido na região de Évora: Aspectos químicos, bioquímicos do leite obtido em diferentes sistemas de produção e físico-químicos, bioquímicos, tecnológicos e organolépticos do queijo, *Tese de Doutoramento*, Universidade de Évora

- Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Ferreira, M. (2004) Discriminate analysis of the volatile fraction from "Terrincho" ewe cheese: correlation with flavour characteristics, *Int. Dairy Journal* 14, 455–464
- Pinho, O., Pérès, C., Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2003) Solid-phase microextraction of volatile compounds in "Terrincho" ewe cheese. Comparison of different fibres, *J. Chromatogr. A* 1011, 1-9
- Poerschmann, J. (2000) Sorption of Hydrophobic Organic Compounds on Nonpolar SPME Fibers and Dissolved Humic Organic Matter—Part III: Application of the Solubility Parameter Concept to Interpret Sorption on Solid Phase Microextraction (SPME) Fiber Coatings, *J. Microcolumn Separations*, 12, 603-612
- Povolo, M., Contarini, G. (2003) Comparison of solid-phase microextraction and purge-and-trap methods for the analysis of the volatile fraction of butter, *J. Chromatogr. A* 985, 117-125
- Rabe, S., Krings, U., Dattatreya, S.B., Berger, R.G. (2002) Computerized apparatus for measuring dynamic flavor release from liquid food matrices, *J. Agric. Food Chem.* 50, 6440–6444
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. A., Wilbey, R. A. (2003) Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses, *Int. Journal of Dairy Technology*, 56, 76–85
- Rothe, M (1988) Introduction to Aroma Research - Handbook of Aroma Research, *Akademie-Verlag*, Berlin
- Ruth, S. M. (2004) Evaluation of two gas chromatography–olfactometry methods: the detection frequency and perceived intensity method, *J. Chromatogr. A* 1054, 33–37
- Schaller, E., Bosset, J.O., Escher, F. (1998) Electronic noses and their application to food: a review, *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 31, 305–316
- Silva, R. C., Aguiar, P. M. S., Augusto, F. (2004) Coupling of Dynamic Headspace Sampling and Solid Phase Microextraction, *Chromatographia* 60 (11/12), 687–691
- Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H. (2001) Advances in the study of proteolysis during cheese ripening, *Int. Dairy Journal* 11, 327–345
- Supelco (1998) Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions, *Bulletin* 923, Sigma-Aldrich Co.
- Supelco (1998a) Solid Phase Microextraction: Solventless Sample Preparation for Monitoring Flavor Compounds by Capillary Gas Chromatography, *Bulletin* 869A, Sigma-Aldrich Co.

- Supelco (2000), The Reporter vol 18.4, Sigma-Aldrich Co
- Supelco (2001) Solid Phase Microextraction Troubleshooting Guide, *Bulletin* 928, Sigma-Aldrich Co.
- Supelco (2001a) A Practical Guide to Quantitation with Solid Phase Microextraction, *Bulletin* 929, Sigma-Aldrich Co.
- Taborda, G., Molina, E., Martínez-Castro, I., Ramos, M., Amigo, L. (2003) Composition of the Water-Soluble Fraction of Different Cheeses, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 270-276
- Tavaria, F.K., Dahl, S., Carballo, F.J., Malcata, F.X. (2002) Amino Acid Catabolism and Generation of Volatiles by Lactic Acid Bacteria, *J. Dairy Sci.* 85, 2462-2470
- ThermoFinnigan (2001), Polaris Q Mass Spectrometer Hardware Manual, E.U.A.
- Valero, E., Villaseñor, M. J., Sanz, J., Castro, I. M. (2000) Comparison of two methods based on dynamic headspace for GC-MS analysis of volatile components of cheeses, *Chromatographia* 52, 340-344
- Valor, I., Pérez, M., Cortada, C., Apraiz, D., Moltó, J.C., Font, G. (2001) SPME of 52 pesticides and polychlorinated biphenyls: Extraction efficiencies of the SPME coatings poly(dimethylsiloxane), polyacrylate, poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene, Carboxenpoly(dimethylsiloxane), and Carbowaxdivinylbenzene, *J. Sep. Sci.*, 24, 39-48
- Vas, G., & Vékey, K. (2004) Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis, *J. Mass Spectrom.* 39, 233-254
- Vichi, S., Castellote, A.I., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2003) Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection, *J. Chromatogr. A* 983, 19-33
- Walles, M., Gu, Y., Dartiguenave, C., Musteata, F.M., Waldron, K., Lubda, D., Pawliszyn, J. (2004) Approaches for coupling solid-phase microextraction to nanospray, *J. Chromatogr. A*, 1067 (1-2), 197-205
- Wang, A., Fang, F., Pawliszyn, J. (2005) Sampling and determination of volatile organic compounds with needle trap devices, *J. Chromatogr. A* 1072 (1), 127-135
- Wang, Q., O'Reilly, J., Pawliszyn, J. (2004) Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation, *J. Chromatogr. A* 1071(1-2), 147-154
- Wang, Y., O'Reilly, J., Chen, Y., Pawliszyn, J. (2005) Equilibrium in-fibre standardisation technique for solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A* 1072 (1), 13-17
- Wittmann, C., Hans, M., Bluemke, W. (2002) Metabolic physiology of aroma-producing

## Referências Bibliográficas

---

- Kluyveromyces marxianus*, *Yeast* 19, 1351–1363
- Wu, J., Pawliszyn, J. (2004) Solid-phase microextraction based on polypyrrole films with different counter ions, *Analytica Chimica Acta* 520, 257–264
- Xiong, G., Chen, Y., Pawliszyn, J. (2003) On-site calibration method based on stepwise solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A* 999 43–50
- Yang, Y., Miller, D.J., Hawthorne, S.B. (1998) Solid-phase microextraction of polychlorinated biphenyls, *J. Chromatogr. A* 800, 257-266
- Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., Gripon, J.C. (1997) An Aminotransferase from *Lactococcus lactis* Initiates Conversion of Amino Acids to Cheese Flavor Compounds, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (2), 414-419
- Ziino, M., Condurso, C., Romeo, V., Giuffrida, D., Verzera, A. (2005), Characterization of “Provola dei Nebrodi”, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS, *Int. Dairy Journal* 15, 585-593

## ANEXO I

### Fabrico do Queijo

**Tabela I.1:** Registos do fabrico do Lote 1 e Lote 2

	LOTE 1	LOTE 2
<b>Matéria prima</b>		
leite ovelha cru	475 L	343L
<b>Coagulação</b>		
Temperatura	34,6°C	34,3°C
Sal	9,5kg	6,860
Agente coagulante*	2,365L	1,715L

\* extracto de 1kg de cardo em 10L de H<sub>2</sub>O

A coalhada é colocada nos moldes, os queijos são virados 3 vezes com intervalos de 15 a 20 minutos, antes de irem para a câmara 1.

No dia seguinte são desenformados e voltam a ser colocados na câmara 1, é feita uma lavagem e a adição de um agente anti-fúngico no 7º dia de cura. Os queijos são virados 3 vezes por semana.

Condições das câmaras de cura:

Câmara 1 - (dos 0 aos 7 dias)

T= 9-11°C

96% humidade

Câmara 2 - (a partir dos 7 dias)

T= 13-15°C

72-80% humidade

### Registo do peso, altura e diâmetro dos queijos recolhidos

**Tabela I.2:** Registo do peso, altura e diâmetro dos queijos (Q1, Q2 e Q3) dos Lotes 1 e 2, com 0, 21 e 42 dias de maturação

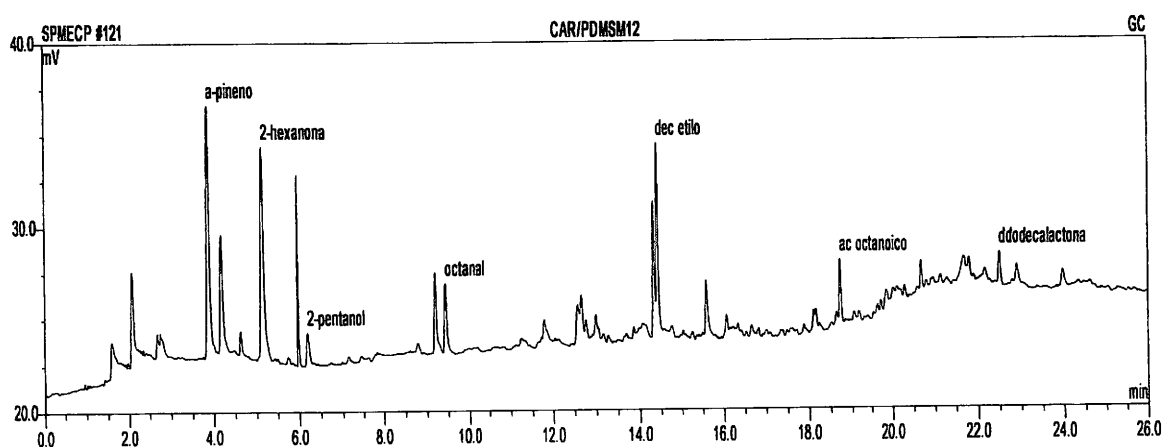
fase da maturação	LOTE 1			LOTE 2			media	dpad
	Q1	Q2	Q3	Q1	Q2	Q3		
	<b>peso (g)</b>							
0 dias	179,02	183,05	161,88	156,97	180,74	172,94	172,43	10,73
21 dias	78,08	91,69	87,84	95,4	84,21	88,83	87,68	6,02
42 dias	78,39	67,64	75,82	79,9	86,75	68,67	76,20	7,21
	<b>diâmetro (cm)</b>							
0 dias	6,7	6,7	6,7	6,7	6,6	6,7	6,7	0,0
21 dias	6,1	6,5	6,1	6,9	6,9	6,5	6,5	0,4
42 dias	6,2	6,2	6,1	6,5	6,6	6,6	6,4	0,2
	<b>altura (cm)</b>							
0 dias	3,8	3,9	3,4	3,4	4	3,8	3,7	0,3
21 dias	2	2,5	2,6	2,1	1,9	2,3	2,2	0,3
42 dias	2,2	2	2,3	1,9	2,3	1,8	2,1	0,2



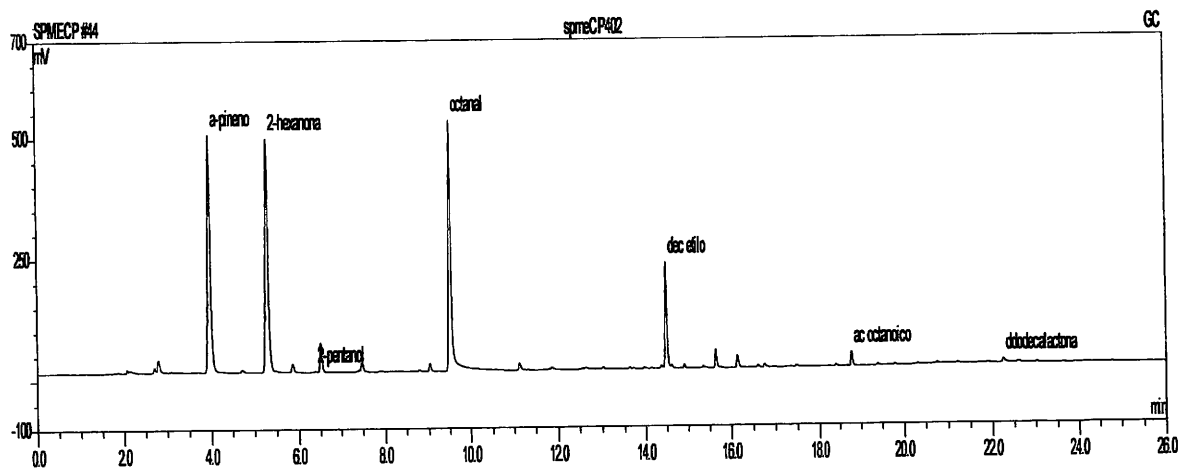
## ANEXO II

**Resultados obtidos por GC-FID para a avaliação das fibras CAR/PDMS, PDMS/DVB e PDMS**

**Figura II.1:** Cromatograma obtido por GC-FID da extracção da mistura modelo ( $\alpha$ -pineno, 2-hexanona, 2-pentanol, octanal, decanoato de etilo, ácido octanoico e  $\delta$ -dodecalactona) com a fibra CAR/PDMS. Condições cromatográficas descritas em *Material e Métodos* no ponto 2.3.1



**Figura II.2:** Cromatograma obtido por GC-FID da extracção da mistura modelo ( $\alpha$ -pineno, 2-hexanona, 2-pentanol, octanal, decanoato de etilo, ácido octanoico e  $\delta$ -dodecalactona) com a fibra PDMS. Condições cromatográficas descritas em *Material e Métodos* no ponto 2.3.1



▪ temperatura de extracção

**Tabela II.1:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos na extracção com a fibra CAR/PDMS a diferentes temperaturas (40, 60 e 80°C)

	40°C					60°C					80°C				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	0,1426	0,3464	0,7198	0,4029	0,2927	0,8849	0,8146	0,9473	0,8823	0,0664	0,7922	0,8727	1,0479	0,9043	0,1307
2-hexanona	1,4913	1,5334	1,2601	1,4283	0,1472	1,8293	1,3519	1,8683	1,6832	0,2875	1,5076	1,3544	1,7627	1,5416	0,2063
2-pentanol	0,2423	0,1074	0,114	0,1546	0,0761	0,1546	0,1641	0,1434	0,1540	0,0104	0,2085	0,2039	0,2633	0,2252	0,0330
octanal	0,4408	0,5206	0,4173	0,4596	0,0541	0,6074	0,5515	0,5483	0,5691	0,0332	0,5164	0,6221	0,583	0,5738	0,0534
dec. Etilo	0,5976	0,6196	1,204	0,8071	0,3439	1,2025	1,2919	1,1959	1,2301	0,0536	1,5918	1,4244	1,3092	1,4418	0,1421
ac. octanoico	0,3548	0,5975	0,2319	0,3947	0,1860	0,2724	0,2736	0,3046	0,2835	0,0183	0,373	0,2955	0,2993	0,3226	0,0437
dodecalactona	0,0786	0,1092	0,0686	0,0855	0,0212	0,1601	0,1873	0,1844	0,1773	0,0149	0,1654	0,2018	0,2276	0,1983	0,0313

**Tabela II.2:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos na extracção com a fibra PDMS/DVB a diferentes temperaturas (40, 60 e 80°C)

	40°C					60°C					80°C				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	57,0347	33,7863	32,6578	41,1596	13,7598	18,2092	14,2827	15,0887	15,8602	2,0738	21,069	18,2157	17,4577	18,9141	1,9043
2-hexanona	44,3135	33,3898	63,8286	47,1773	15,4202	41,2145	33,6616	40,3439	38,4067	4,1323	19,5426	17,7915	19,7136	19,0159	1,0638
2-pentanol	38,6409	39,3699	32,966	36,9923	3,5058	36,207	31,9224	33,3275	33,8190	2,1842	15,8376	14,4147	15,7574	15,3366	0,7994
octanal	20,8524	10,4973	7,4817	12,9438	7,0131	14,2597	20,9082	14,4175	16,5285	3,7938	82,4116	78,1961	75,736	78,7812	3,3760
dec. etilo	1,1511	0,8998	1,3371	1,1293	0,2195	0,9494	0,6436	0,9065	0,8332	0,1656	0,5979	0,5718	0,3644	0,5114	0,1279
ac. octanoico	0,1895	0,2008	0,1763	0,1889	0,0123	0,3014	0,318	0,2686	0,2960	0,0251	0,6412	0,6183	0,5187	0,5927	0,0651
dodecalactona	0,6545	0,4208	0,4145	0,4966	0,1368	0,2381	0,266	0,1905	0,2315	0,0382	0,152			0,1520	

**Tabela II.3:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos na extracção com a fibra PDMS a diferentes temperaturas (40, 60 e 80°C)

	40°C					60°C					80°C				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	14,1092	10,1348	15,0244	13,0895	2,5994	13,0382	8,0097	8,6114	9,8864	2,7460	7,4801	18,0351	11,7168	12,4107	5,3116
2-hexanona	5,6696	5,3271	5,4583	5,4850	0,1728	5,6291	5,4288	5,8745	5,6441	0,2232	4,6412	4,7249	4,4768	4,6143	0,1262
2-pentanol	2,5901	2,4335	2,5041	2,5092	0,0784	3,0626	2,7994	3,0543	2,9721	0,1496	2,8981	3,1078	2,989	2,9983	0,1052
octanal	4,2716	4,6263	5,5326	4,8102	0,6503	14,9433	8,9985	12,5142	12,1520	2,9889	14,0505	18,7076	24,2601	19,0061	5,1113
dec. etilo	1,2267	0,8627	0,5656	0,8850	0,3311	0,7846	0,5361	1,0611	0,7939	0,2626	0,532	0,4931	0,5305	0,5185	0,0220
ac. octanoico	0,5552	0,708	0,2466	0,5033	0,2350	0,9663	0,5894	1,6826	1,0794	0,5553	0,5528	0,5959	0,4638	0,5375	0,0674
dodecalactona	0,152	0,1634	0,1778	0,1644	0,0129	0,692	0,6971	0,6311	0,6734	0,0367	1,9951	1,8699	1,9981	1,9544	0,0732

▪ **tempo de extracção**

**Tabela II.4:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos para os diferentes tempos de extracção (10, 20, 30 e 40min) com a fibra CAR/PDMS

	10min					20 min				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	0,6421	0,5925	0,5662	0,6003	0,0385	0,8849	0,8146	0,9473	0,8823	0,0664
2-hexanona	1,1363	1,2905	1,2561	1,2276	0,0809	1,8293	1,3519	1,8683	1,6832	0,2875
2-pentanol	0,1518	0,1225	0,118	0,1308	0,0184	0,1546	0,1641	0,1434	0,1540	0,0104
octanal	0,494	0,4572	0,4801	0,4771	0,0186	0,6074	0,5515	0,5483	0,5691	0,0332
dec. etilo	0,2273	0,1916	0,1654	0,1948	0,0311	0,2724	0,2736	0,3046	0,2835	0,0183
ac.octanoico	1,1585	1,1268	1,0547	1,1133	0,0532	1,2025	1,2919	1,1959	1,2301	0,0536
dodecalactona	0,1587	0,1427	0,1561	0,1525	0,0086	0,1601	0,1873	0,1844	0,1773	0,0149

	30min					40 min				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	0,9343	1,1129	1,2553	1,1008	0,1608	1,069	0,8995	0,6333	0,8673	0,2196
2-hexanona	1,4811	2,007	2,2581	1,9154	0,3965	1,2188	1,7901	0,9619	1,3236	0,4239
2-pentanol	0,2031	0,2482	0,2441	0,2318	0,0249	0,1682	0,2584	0,1915	0,2060	0,0468
octanal	0,6793	0,7681	0,7023	0,7166	0,0461	0,6077	0,758	0,6877	0,6845	0,0752
dec. etilo	0,2915	0,2669	0,3256	0,2947	0,0295	0,6837	0,2459	0,267	0,3989	0,2469
ac.octanoico	1,5503	1,7387	1,4712	1,5867	0,1374	1,1083	1,4952	1,4431	1,3489	0,2100
dodecalactona	0,2792	0,3128	0,2287	0,2736	0,0423	0,2322	0,3451	0,2529	0,2767	0,0601

**Tabela II.5:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos para os diferentes tempos de extracção (5, 10, 20 e 30min) com a fibra PDMS/DVB

	5min					10 min				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	36,6127	42,4729	40,8952	39,9936	3,0324	27,0275	38,3277	40,1718	35,1757	7,1165
2-hexanona	53,8845	56,3255	52,1383	54,1161	2,1032	51,199	53,4607	55,3636	53,3411	2,0849
2-pentanol	0,7930	0,6080	0,5920	0,6643	0,1117	0,9191	0,8477	0,9039	0,8902	0,0376
octanal	13,667	14,8929	14,4139	14,3246	0,6178	22,6533	22,9236	23,6856	23,0875	0,5353
dec. etilo	0,2152	0,2118	0,1973	0,2081	0,0095	0,4423	0,2779	0,2263	0,3155	0,1128
ac.octanoico	2,5823	3,3328	2,1726	2,6959	0,5884	3,8938	5,2924	4,1567	4,4476	0,7433
dodecalactona	0,207	0,1844	0,1700	0,1871	0,0187	0,1774	0,2602		0,2188	0,0585

	20min					30 min				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	57,0347	33,7863	32,6578	41,1596	13,7598	22,5478	24,8057	22,7980	23,3838	1,2377
2-hexanona	44,3135	33,3898	63,8286	47,1773	15,4202	48,6885	49,1793	51,7357	49,8678	1,6361
2-pentanol	1,1511	0,8998	1,3371	1,1293	0,2195	1,1435	0,7223	1,2469	1,0376	0,2779
octanal	38,6409	39,3699	32,9660	36,9923	3,5058	36,1449	36,4886	38,5556	37,0630	1,3040
dec. etilo	0,1895	0,2008	0,1763	0,1889	0,0123	0,5429	0,6511	0,4513	0,5484	0,1000
ac.octanoico	20,8524	10,4973	7,4817	12,9438	7,0131	4,7189	4,6828	4,2865	4,5627	0,2399
dodecalactona	0,6545	0,4208	0,4145	0,4966	0,1368	0,1543	0,1965		0,1754	0,0298

**Tabela II.6:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto da mistura modelo obtidos para os diferentes tempos de extracção (5, 10, 20 e 30min) com a fibra PDMS

	5min					10 min				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	0,7694	0,5581	0,5464	0,6246	0,1255	15,2560	10,7029	9,3087	11,7559	3,1103
2-hexanona	1,4908	1,1776	1,0103	1,2262	0,2439	5,3435	5,8992	6,1082	5,7836	0,3952
2-pentanol	0,2523	0,2213	0,1467	0,2068	0,0543	0,4841	0,5806	0,5408	0,5352	0,0485
octanal	0,5478	0,4578	0,3507	0,4521	0,0987	2,7870	2,7172	2,9035	2,8026	0,0941
dec. etilo	0,4811	0,2847	0,2111	0,3256	0,1396	0,5576	0,5299	0,5342	0,5406	0,0149
ac.octanoico	0,6134	0,6527	0,2398	0,5020	0,2279	15,5367	13,7956	10,9948	13,4424	2,2915
dodecalactona	0,0206		0,0232	0,0219	0,0018	0,3745	0,3682	0,3427	0,3618	0,0168

	20min					30 min				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	13,0382	8,0097	8,6114	9,8864	2,7460	4,2187			4,2187	
2-hexanona	5,6291	5,4288	5,8745	5,6441	0,2232	5,3300			5,3300	
2-pentanol	0,7846	0,5361	1,0611	0,7939	0,2626	0,5342			0,5342	
octanal	3,0626	2,7994	3,0543	2,9721	0,1496	2,4322			2,4322	
dec. etilo	0,9663	0,5894	1,6826	1,0794	0,5553	0,6420			0,6420	
ac.octanoico	14,9433	8,9985	12,5142	12,1520	2,9889	5,3935			5,3935	
dodecalactona	0,6920	0,6971	0,6311	0,6734	0,0367	0,8198			0,8198	

▪ **factores de resposta e linearidade**

**Tabela II.7:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto na extracção com a fibra CAR/PDMS das mistura modelo M1, M2 ,M3, M4 e M5

	M1					M2					M3				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	1,2086	0,9979	0,2911	0,8325	0,4806		0,0189		0,0189		0,1029	0,0835	0,0955	0,0940	0,0098
2-hexanona	1,2273	1,0033	0,7671	0,9992	0,2301		0,1712		0,1712		0,4659	0,4350	0,4021	0,4343	0,0319
2-pentanol	0,2011	0,1194	0,1217	0,1474	0,0465		0,1253		0,1253		0,0371		0,0468	0,0420	0,0069
octanal	0,2442	0,2539	0,1560	0,2180	0,0539	0,1026	0,2733		0,1880	0,1207	0,1508	0,1522	0,1410	0,1480	0,0061
dec. etilo	0,4717	0,5498	0,4239	0,4818	0,0636	0,0242	0,0464		0,0353	0,0157	1,0695	0,0708	0,0254	0,3886	0,5901
ac. octanoico	0,2555	0,1856	0,2906	0,2439	0,0535	0,0703	0,0318		0,0511	0,0272	0,1365	0,0695	0,1004	0,1021	0,0335
dodecalactona	0,1251	0,1008	0,1174	0,1144	0,0124	0,0921	0,0664		0,0793	0,0182	0,0899	0,1113	0,1180	0,1064	0,0147

	M4					M5				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	0,0481	0,0329	0,0148	0,0319	0,0167	0,0176	0,0204		0,0190	0,0020
2-hexanona	0,0687	0,0684	0,0755	0,0709	0,0040	0,0428	0,0080	0,0925	0,0478	0,0425
2-pentanol		0,0121		0,0121	#DIV/0!	0,0112		0,0432	0,0272	0,0226
octanal	0,0495	0,0465	0,0270	0,0410	0,0122		0,0705	0,0350	0,0528	0,0251
dec. etilo	0,0016			0,0016	#DIV/0!					
ac. octanoico	0,0629	0,0430	0,0873	0,0644	0,0222	0,0771	0,0611	0,0635	0,0672	0,0086
dodecalactona	0,1595	0,0647	0,0280	0,0841	0,0679	0,0650	0,0689	0,0554	0,0631	0,0069

**Tabela II.8:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto na extracção com a fibra PDMS/DVB das mistura modelo M1, M2 ,M3, M4 e M5

	M1					M2					M3				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	27,3924	22,8506	27,8136	26,0189	2,7519	14,7669	9,4080	21,8978	15,3576	6,2658	14,3709	4,5979	5,6129	8,1939	5,3735
2-hexanona	35,3396	43,5107	41,0313	39,9605	4,1895	29,1043	30,6218	29,1132	29,6131	0,8736	9,2859	11,3415	11,1150	10,5808	1,1271
2-pentanol	3,3410	4,1212	3,8877	3,7833	0,4004	2,5869	2,3807	2,1200	2,3625	0,2340	1,3709	1,1046	0,9979	1,1578	0,1921
octanal	32,0940	26,8842	24,8866	27,9549	3,7211	11,9952	10,6056	11,8464	11,4824	0,7630	6,6518	3,6038	5,0504	5,1020	1,5247
dec. etilo	3,7336	3,7652	10,4786	5,9925	3,8851	5,2614	2,2513	2,4949	3,3359	1,6720	2,3370	1,3244	1,4226	1,6947	0,5584
ac. octanoico	0,4666	0,2087	0,4045	0,3599	0,1346	0,1650	0,1552	0,1267	0,1490	0,0199	0,2422	0,0959	0,0878	0,1420	0,0869
dodecalactona	0,2258	0,0899	0,0917	0,1358	0,0779	0,1134	0,0919	0,0564	0,0872	0,0288	0,0735	0,2067	0,0872	0,1225	0,0733

	M4					M5				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	0,5334	0,7837	0,9842	0,7671	0,2259	0,5194	0,8599	0,6687	0,6827	0,1707
2-hexanona	1,1176	1,5676	1,5400	1,4084	0,2522	1,6373	1,5388	1,7663	1,6475	0,1141
2-pentanol	0,3009	0,1254	0,0525	0,1596	0,1277	0,1914	0,2340	0,2687	0,2314	0,0387
octanal	0,9076	1,1348	1,1826	1,0750	0,1469	0,6631	0,5703	0,8288	0,6874	0,1310
dec. etilo	0,0133	0,0244	0,0180	0,0186	0,0056		0,7102	0,0063	0,3583	0,4977
ac.octanoico	0,0778	0,0802	0,0711	0,0764	0,0047	0,0890	0,0802	0,0838	0,0843	0,0044
dodecalactona	0,0438	0,1013	0,1722	0,1058	0,0643	0,0596	0,2093	0,0753	0,1147	0,0823

**Tabela II.9:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão para cada composto na extracção com a fibra PDMS das mistura modelo M1, M2 ,M3, M4 e M5

	M1					M2					M3				
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad
a-pineno	0,3599	0,1325		0,2462			0,2125	0,2369	0,2247		0,0749	0,0877		0,0813	0,3599
2-hexanona	0,7593			0,7593			0,1595	0,2541	0,2068		0,1118	0,1077		0,10975	0,7593
2-pentanol	0,1731			0,1731			0,0291	0,0427	0,0359		0,0187	0,0213		0,02	0,1731
octanal	0,4142			0,4142			0,0665	0,114	0,09025		0,067	0,0752		0,0711	0,4142
dec. etilo	0,39			0,39			0,2279	0,3813	0,3046		0,0774	0,1029		0,09015	0,39
ac. octanoico															
dodecalactona															

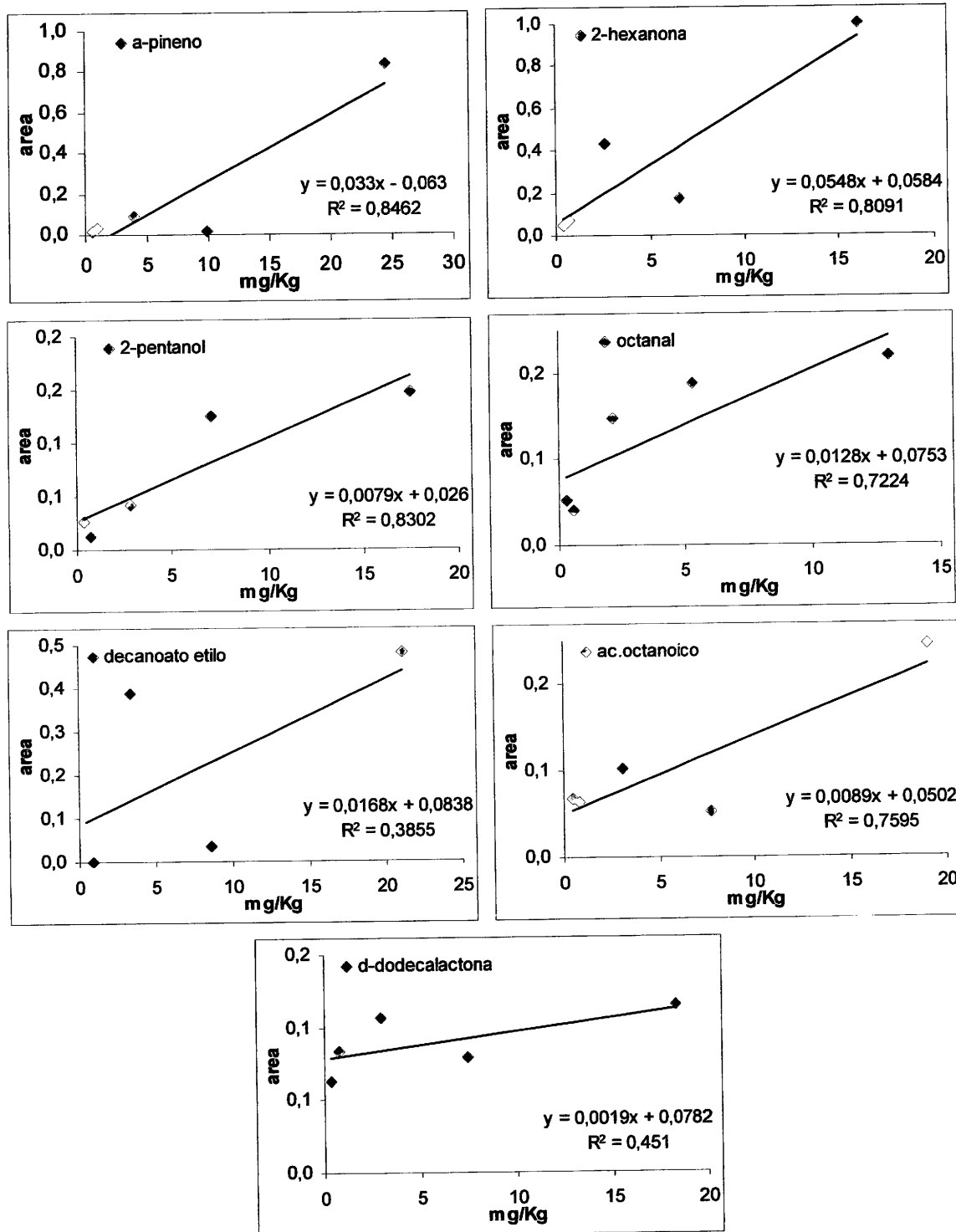
	M4					M5					
	area 1	area 2	area 3	media	dpad	area 1	area 2	area 3	media	dpad	
a-pineno				0,0282	0,0282						
2-hexanona											
2-pentanol											
octanal	0,0149			0,0181	0,0165				0,0154	0,0154	0,0149
dec. etilo											
ac.octanoico											
dodecalactona											

**Tabela II.10:** Área do pico cromatográfico, média e desvio padrão obtidos na extração das misturas M1, M2 e M3 (contendo o ácido octanóico e  $\delta$ -dodecalactona isolados) com a fibra PDMS/DVB

	M1				M2				M3			
	area 1	area 2	media	dpad	area 1	area 2	media	dpad	area 1	area 2	media	dpad
ac.octanoico	0,4255	0,149	0,28725	0,195515	0,1014	0,0794	0,0904	0,015556	0,2782	0,1248	0,2015	0,10847
dodecalactona	0,0857	0,0637	0,0747	0,015556	0,0375	0,0683	0,0529	0,021779	0,025	0,138	0,0815	0,079903

## ▪ rectas de calibração

Figura II.3: Rectas de calibração obtidas para a extracção com a fibra CAR/PDMS





**Figura II.3:** Rectas de calibración obtidas para a extracção com a fibra PDMS/DVB

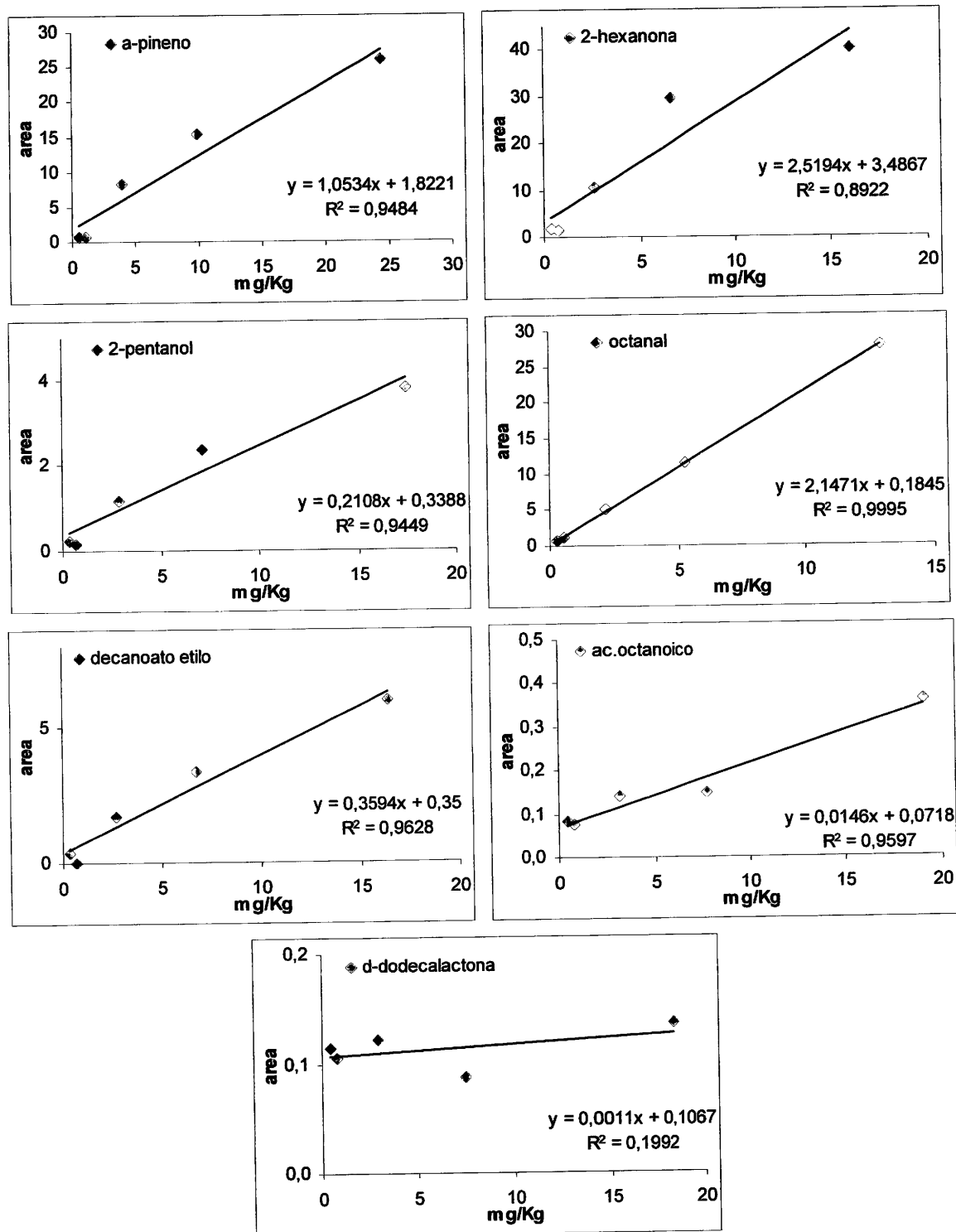
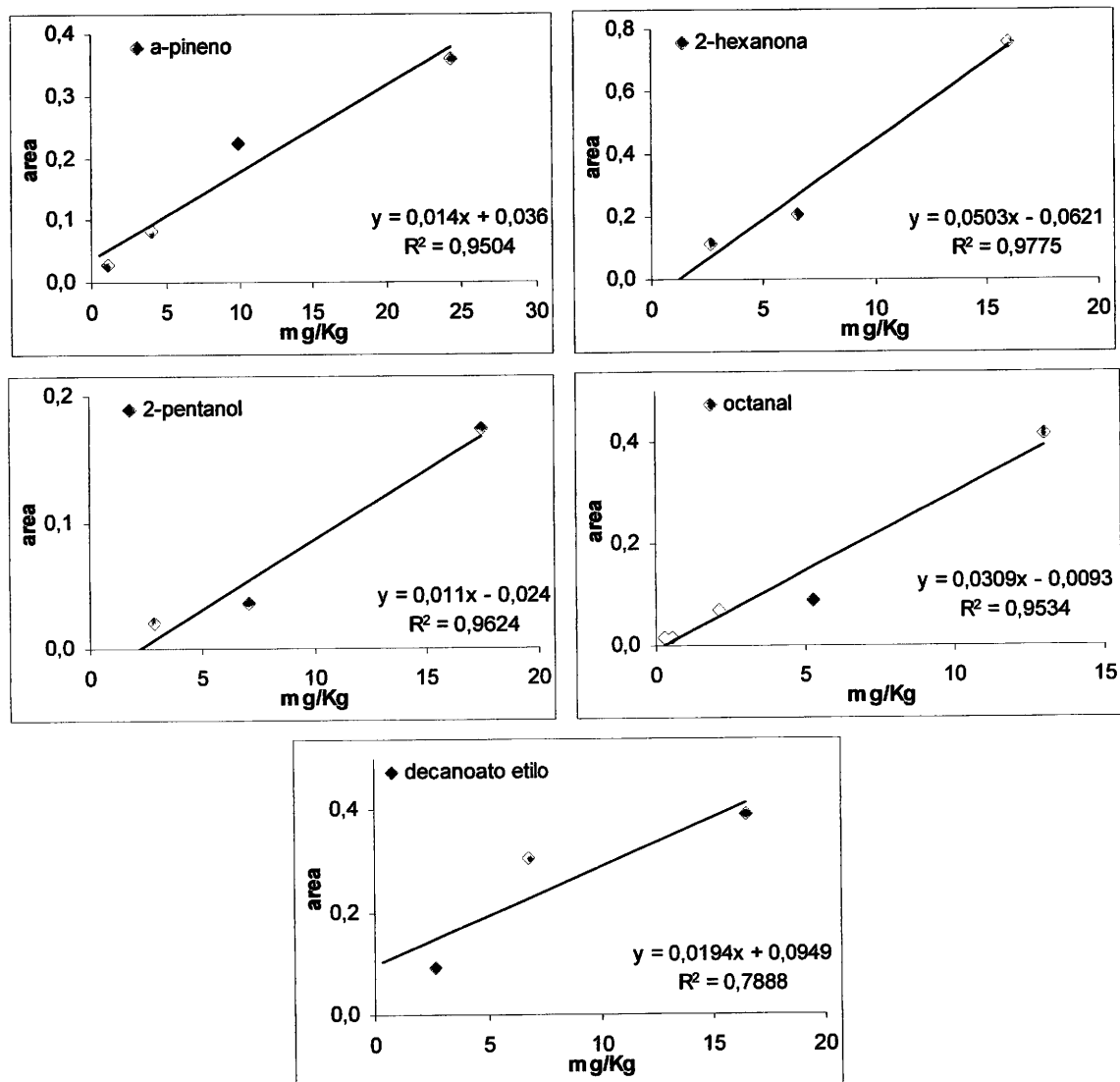


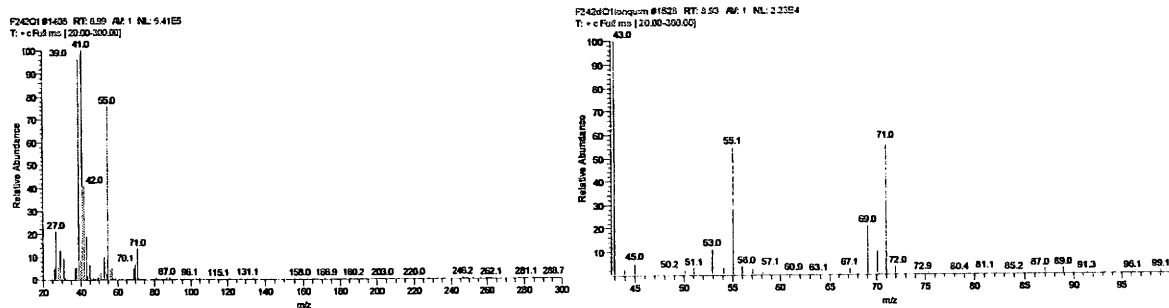
Figura II.3: Rectas de calibração obtidas para a extracção com a fibra PDMS



## ANEXO III

### Espectros de massa obtidos para o 3-metilbutanol, 2,5-dimetil-3-hexanol, composto não identificado e ácido nonanóico

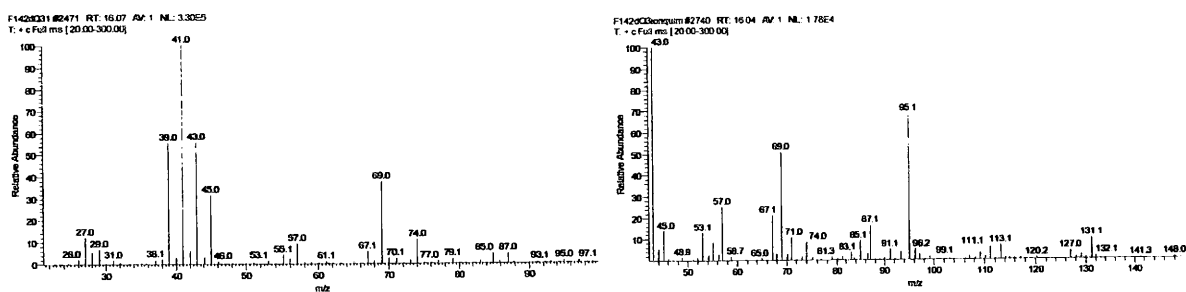
**Figura III.1:** Espectro de massa do 3-metilbutanol obtido por EI a 70eV *full scan* (a), por CI com CH<sub>4</sub> a um fluxo de 0,5mL/min (b)



(a)

(b)

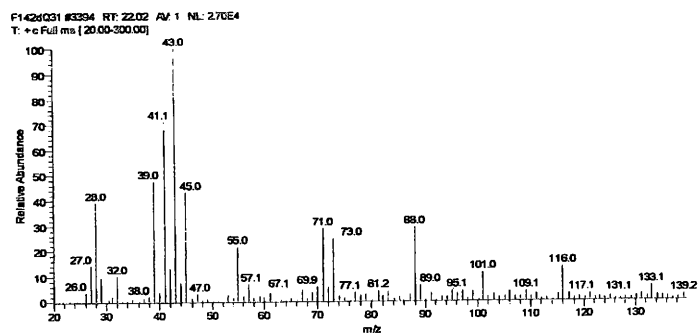
**Figura III.2:** Espectro de massa do 2,5-dimetil-3-hexanol obtido por EI a 70eV *full scan* (a), por CI com CH<sub>4</sub> a um fluxo de 0,5mL/min (b)

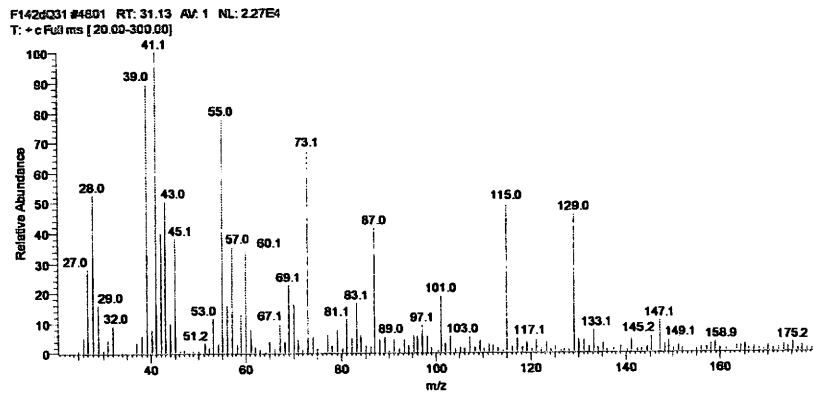


(a)

(b)

**Figura III.3:** Espectro de massa do composto não identificado obtido por EI a 70eV *full scan*



**Figura III.4:** Espectro de massa do ácido nonanóico obtido por EI a 70eV *full scan*

## ANEXO IV

## Resultados obtidos na análise de compostos voláteis do queijo

Tabela IV.1 Valores médios da área cromatográfica obtida na extração de cada queijo (1,2 e 3) de cada fase de maturação (0, 21 e 42 dias)

fase de maturação fabrico	0 dias				21 dias				42 dias			
	1		2		1		2		1		2	
	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.
2-pentanol	0,000	0,0000	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,023	0,0447	0,000	0,0000	0,287	0,2378
3-metilbutanol	3,344	1,4848	2,771	1,001	11,049	0,7801	9,107	3,4042	6,316	1,5247	7,487	0,5009
hexanoato de etilo	0,000	0,0000	0,000	0,000	0,509	0,1081	2,016	0,2269	0,969	0,2424	5,075	0,7146
acetol	0,971	0,5791	0,258	0,233	2,993	0,6250	1,680	0,5019	8,034	4,6250	2,057	0,2954
octanal	0,000	0,0000	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,000	0,0000	0,000	0,0000	0,203	0,0789
ácido acético	0,000	0,0000	0,000	0,000	7,487	1,7372	6,938	1,1296	8,623	2,5167	13,175	2,3557
2,5dimetil-3-hexanol	0,025	0,0495	0,000	0,000	1,921	0,3237	0,000	0,0000	2,396	0,5820	0,000	0,0000
2,3-butanediol (isom.1)	0,000	0,0000	0,000	0,000	10,491	2,3554	7,734	1,9496	15,851	3,4667	12,608	2,6627
ácido isobutírico	0,000	0,0000	0,000	0,000	0,957	0,2244	0,478	0,0631	0,937	0,2240	0,427	0,0726
2,3-butanediol (isom.2)	0,000	0,0000	0,047	0,098	19,191	4,0935	12,462	2,9480	21,698	3,7554	14,401	2,6208
ácido butanóico	0,000	0,0000	0,078	0,079	12,208	1,6871	20,847	2,8818	18,923	5,2181	31,258	3,2224
decanoato de etilo	0,606	0,1467	0,726	0,096	0,286	0,0695	0,238	0,0579	0,261	0,1217	0,209	0,0442
ácido isovalérico	0,000	0,0000	0,000	0,000	5,566	1,0281	3,098	0,5137	5,531	0,5813	2,938	0,8105
não-identificado	0,000	0,0000	0,000	0,000	0,059	0,0562	0,133	0,0261	0,116	0,0462	0,181	0,0257
ácido hexanóico	0,315	0,0359	0,248	0,083	9,313	0,6883	14,330	3,1758	13,598	2,0179	17,280	2,0937
feniletanol	0,000	0,0000	0,000	0,000	0,626	0,2249	0,769	0,0871	0,608	0,2742	0,455	0,1001
ácido octanóico	0,589	0,0849	0,451	0,132	4,424	0,2289	4,944	0,9799	6,039	0,6274	5,657	0,8392
ácido 2,4-hexadienóico	0,000	0,0000	0,064	0,061	0,601	0,1376	0,902	0,1501	0,631	0,2013	0,542	0,0663
ácido nonanóico	0,226	0,0858	0,000	0,000	0,342	0,0836	0,000	0,0000	0,384	0,2068	0,000	0,0000
ácido decanóico	0,557	0,1539	0,436	0,142	1,863	0,3509	1,686	0,3649	2,632	0,2799	2,309	0,5536

▪ **análise de variância (ANOVA)**

**Tabela IV.1** Valores da análise ANOVA para a fase de maturação (FM) de 0, 21 e 42 dias

**(a) 2-pentanol**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	0,22993	0,22993	0,11496	6,96	0,002
Error	51	0,84245	0,84245	0,01652		
Total	53	1,07238				

**(b) 3-metilbutanol**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	444,85	444,85	222,43	67,34	0,000
Error	51	168,45	168,45	3,30		
Total	53	613,31				

**(c) hexanoato de etilo**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	82,929	82,929	41,465	23,20	0,000
Error	51	91,154	91,154	1,787		
Total	53	174,083				

**(d) acetoina**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
fase de	2	179,630	179,630	89,815	13,06	0,000
Error	51	350,860	350,860	6,880		
Total	53	530,490				

**(e) octanal**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	0,123235	0,123235	0,061617	13,39	0,000
Error	51	0,234624	0,234624	0,004600		
Total	53	0,357858				

**(f) ácidos acético**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	1106,36	1106,36	553,18	125,95	0,000
Error	51	224,00	224,00	4,39		
Total	53	1330,36				

**(g) 2,5-dimetil-3-hexanol**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	14,1638	14,1638	7,0819	7,85	0,001
Error	51	46,0073	46,0073	0,9021		
Total	53	60,1711				

**(h) 2,3-butanediol (isómero 1)**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	1870,20	1870,20	935,10	154,25	0,000
Error	51	309,18	309,18	6,06		
Total	53	2179,39				

## (i) ácido isobutírico

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	5,8909	5,8909	2,9454	48,77	0,000
Error	51	3,0802	3,0802	0,0604		
Total	53	8,9711				

## (j) 2,3-butanediol (isómero 2)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	3477,6	3477,6	1738,8	108,83	0,000
Error	51	814,8	814,8	16,0		
Total	53	4292,5				

## (l) ácido butanóico

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	5836,5	5836,5	2918,3	105,49	0,000
Error	51	1410,8	1410,8	27,7		
Total	53	7247,3				

## (m) decanoato de etilo

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	2,0963	2,0963	1,0481	100,30	0,000
Error	51	0,5330	0,5330	0,0105		
Total	53	2,6293				

## (n) ácido isovalérico

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	220,23	220,23	110,11	73,70	0,000
Error	51	76,20	76,20	1,49		
Total	53	296,42				

## (o) não-identificado

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	0,20419	0,20419	0,10210	54,10	0,000
Error	51	0,09624	0,09624	0,00189		
Total	53	0,30044				

## (p) ácido hexanóico

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	2255,8	2255,8	1127,9	176,19	0,000
Error	51	326,5	326,5	6,4		
Total	53	2582,2				

## (q) feniletanol

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	4,7827	4,7827	2,3914	90,75	0,000
Error	51	1,3439	1,3439	0,0264		
Total	53	6,1266				

## (r) ácido octanóico

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	282,45	282,45	141,23	378,23	0,000
Error	51	19,04	19,04	0,37		
Total	53	301,50				

## (s) ácido 2,4 hexadienóico

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	5,1205	5,1205	2,5603	110,44	0,000
Error	51	1,1823	1,1823	0,0232		
Total	53	6,3028				

## (t) ácido nonanóico

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	0,06035	0,06035	0,03018	0,82	0,446
Error	51	1,87596	1,87596	0,03678		
Total	53	1,93631				

## (u) ácido decanóico

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
FM	2	36,099	36,099	18,050	149,63	0,000
Error	51	6,152	6,152	0,121		
Total	53	42,251				

