

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

LUCIANA DOS SANTOS CANOVA

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM LEITE *UHT* UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA
A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (*HS-SPME-GC-MS*)**

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

LUCIANA DOS SANTOS CANOVA

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM LEITE *UHT* UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA
A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (*HS-SPME-GC-MS*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
junto à atividade de ensino “Projeto
Tecnológico” do curso de Química Industrial,
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Química Industrial.

Prof(a). Dr(a). Tânia Mara Pizzolato
Orientadora

Porto Alegre

2017

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida e que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar com o dom da vida e com minha família, e por me guiar pelo melhor caminho sempre.

Agradeço aos meus pais Altair e Maribel, que me ensinaram a ter valores e princípios, sempre me incentivando a buscar meus objetivos e me apoiando em todas as minhas decisões. Agradeço pela compreensão naqueles momentos em que não pude estar presente nos encontros de família, para estudar para alguma prova. Obrigada por serem os melhores exemplos de vida, de luta, de companheirismo e de amor.

Ao meu esposo Felipe, por estar ao meu lado, me apoiando e incentivando sempre a continuar, e por não desistir naqueles momentos em que tinha que ficar em casa enquanto eu estudava para as provas no final de semana.

Aos meus irmãos, Rafael, Thaís e Daniela, por todo apoio e companheirismo durante todos os anos da graduação. E por me proporcionarem momentos de alegria com meus amados sobrinhos.

Aos amigos e amigas que me acompanham desde o início da graduação, aos que estão comigo até hoje e aos que por um motivo ou outro estão hoje distantes, por sempre me ensinarem a lidar com as situações adversas e me apoiaram em todos os momentos.

À Souza Cruz, e aos colegas que me acompanham nesta caminhada, pela oportunidade ímpar de desenvolvimento profissional e pessoal. Agradeço principalmente por toda a ajuda e compreensão durante este período.

À professora Dr(a). Tânia Mara Pizzolato, pela atenção e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

Albert Einstein

RESUMO

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são classificados de acordo com sua polaridade e ponto de ebulição, desta forma recebem esta denominação todos os compostos apolares com ponto de ebulição entre 50 e 240 °C e todos os compostos polares com ponto de ebulição entre 100 e 260 °C. A determinação desta classe de compostos em amostras de leite submetidos ao processo de ultra alta temperatura (*UHT*) é muito útil na determinação da qualidade deste tipo de leite, que atualmente é um dos mais consumidos pela população. Diferentes metodologias descritas na literatura realizam a identificação destes compostos através da cromatografia a gás, utilizando processos de preparo de amostras e detectores distintos. A grande maioria apresenta métodos de preparo de amostras e de separação cromatográfica com alto dispêndio de tempo, gerando uma diminuição de capacidade produtiva e um aumento dos custos com gases utilizados como fase móvel. O presente trabalho visa o desenvolvimento exploratório de uma metodologia utilizando a microextração em fase sólida e cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas (*HS-SPME-GC-MS*), com o intuito de reduzir custos com gases de fase móvel, bem como aumento de capacidade produtiva para determinação de compostos orgânicos voláteis em leite UHT. As principais etapas desta metodologia consistem em utilização de delineamento de experimentos para determinação de condições ótimas de *HS-SPME*, seguido de avaliação de viabilidade técnica da metodologia cromatográfica proposta. O desenvolvimento de uma metodologia analítica requer alto investimento, já que é necessária aquisição de padrões analíticos para confirmação e quantificação dos compostos presentes nas amostras. Por se tratar de uma metodologia exploratória, não foram utilizados padrões analíticos para confirmação dos analitos identificados, porém, a confirmação dos analitos foi realizada através do espectro de massas reportado pela biblioteca do *National Institute of Standards and Technology (NIST)* e pelo Índice de Kovats, que foi calculado com base nas condições cromatográficas definidas.

Palavras-chave: Compostos Orgânicos Voláteis, COVs, Leite *UHT*, Microextração em Fase Sólida, Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrômetro de Massas, *HS-SPME-GC-MS*.

ABSTRACT

The volatile organic compounds (VOCs) are classified according to their polarity and boiling point, in this way all non polar compounds with a boiling point between 50 and 240 °C and all polar compounds with boiling point between 100 and 260 °C receive this denomination. The determination of this class of compounds in milk samples treated by ultra high temperature process (UHT) is very useful to determine the quality of the milk, which is the most consumed food around the world. Gas chromatography, using different sample preparation process and detectors is the methodology used to identify and qualify these compounds. The sample preparation methodologies uses long analysis times, - that result in reduction of analysis capacity and increase the costs mainly due to the gas used as mobile phase. The present work aims at the evaluation of a methodology using solid phase microextraction and gas chromatography coupled to a mass spectrometer (HS-SPME-GC-MS), to reduce costs and increase the analysis capacity for determination of volatile organic compounds in UHT milk. The main steps of this methodology are the use of experimental design for the determination of HS-SPME optimized conditions, followed by evaluation of the technical feasibility of the proposed chromatographic methodology. Development of an analytical methodology requires high investment, mainly for the acquisition of analytical standards for confirmation and quantification of the compounds present in the samples. An exploratory methodology has the advantage of not needing the analytical standards to evaluate the performance, however, the confirmation of the analites were done by comparing with the mass spectrum reported by the National Institute of Standards and Technology (NIST) library and by the Kovats Index, which was calculated based on the defined chromatographic conditions.

Keywords: Volatile Organic Compounds, VOCs, UHT milk, Solid Phase Microextraction, Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometer, HS-SPME-GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição espacial dos pontos experimentais do desenho experimental Box-Behnken	19
Figura 2 – Representação de dois líquidos imiscíveis com concentração de soluto diferente nos dois solventes	20
Figura 3 – Esquema de um cromatógrafo a gás.....	21
Figura 4 – Componentes de um espectrômetro de massas.....	22
Figura 5 – Dispositivo de Absorção do <i>SPME</i>	24
Figura 6 – Diagrama de Exposição da Fibra de <i>SPME</i>	24
Figura 7 – Gráfico de Probabilidade Normal obtido para o Experimento de Varredura.....	30
Figura 8 – Gráfico de Significância do Modelo para o Experimento de Varredura.....	30
Figura 9 – Efeitos Principais da Variável X_3 (Tempo de Incubação).....	32
Figura 10 – Efeitos Principais da Variável X_5 (Temperatura de Dessorção).....	32
Figura 11 – Efeitos Principais da Variável X_6 (Tempo de Dessorção).....	32
Figura 12 – Probabilidade Normal do Experimento de Otimização.....	33
Figura 13 – Significância do Modelo para o Experimento de Otimização.....	33
Figura 14 – Efeitos Principais da Variável X_1 (Quantidade de NaCl).....	34
Figura 15 – Efeitos Principais da Variável X_2 (Temperatura de Incubação).....	35
Figura 16 – Efeitos Principais da Variável X_4 (Tempo de Extração).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matéria gorda dos diferentes tipos de leite.	15
Tabela 2 – Variáveis e Níveis do Experimento de Varredura	29
Tabela 3– Variáveis e Níveis do Experimento de Otimização	31
Tabela 4 – Condições otimizadas para <i>SPME</i>	35
Tabela 5 – Resultados do Teste de Robustez e Predição.....	36
Tabela 6 – Comparativo entre as condições dos métodos	39

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

NDDP – do inglês *National Dairy Development Plan*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

UHT – do inglês *Ultra High Temperature*

UAT – Ultra Alta Temperatura

COVs – Compostos Orgânicos Voláteis

WHO – do inglês *World Health Organization*

FID – do inglês *Flame Ionization Detector*

TCD – do inglês *Thermal Conductivity Detector*

ECD – do inglês *Electron Capture Detector*

MS – do inglês *Mass Spectrometry*

EI – do inglês *Electrons Impact*

CI – do inglês *Chemical Ionization*

CC – Corrente Contínua

RF – Radiofrequência

SPME – do inglês *Solid Phase Microextraction*

HPLC – do inglês *High Pressure Liquid Chromatography*

HS-SPME-GC-MS – do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry and Headspace Solid Phase Microextraction.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Leite.....	14
2.1.1 <i>Histórico do Leite</i>	14
2.1.2 <i>Características do Leite</i>	15
2.1.3 <i>Processos de Tratamento do Leite</i>	16
2.2 Compostos Orgânicos Voláteis	17
2.3 Delineamentos de Experimentos	17
2.4 Cromatografia	20
2.4.1 <i>Cromatografia a Gás</i>	20
2.4.2 <i>Microextração em Fase Sólida</i>	23
3 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS	25
4 OBJETIVO	26
4.1 Objetivo geral	26
4.2 Objetivos específicos	26
5 METODOLOGIA	27
5.1 Preparo da Amostra	28
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
6.1 Desenhos Experimentais: Planejamento de Ponto Central	29
6.2 Avaliação da Viabilidade da Metodologia	36
6.3 Análise de diferentes amostras de leite.....	38
7 ANÁLISE DE CUSTOS E IMPACTO AMBIENTAL	39
7.1 Análise de Custos	39
7.2 Impacto Ambiental	40
8 CONCLUSÕES	41
BIBLIOGRAFIA	42
APÊNDICE A – PRODUÇÃO DE LEITE EM DIFERENTES PAÍSES, NO PERÍODO DE 1995 A 2014.	44
APÊNDICE B - PRODUÇÃO DE LEITE E VACAS ORDENHADAS POR ESTADO BRASILEIRO	45
APÊNDICE C – PARÂMETROS MÍNIMOS DE QUALIDADE DO LEITE UHT.	46

APÊNDICE D – DEFEITOS DE AROMA E SABOR EM LEITE.....	47
APÊNDICE E – ROTA DO PIRUVATO COMO UM PRECURSOR DE AROMA EM LEITE E SUB-PRODUTOS.	48
APÊNDICE F – CUSTO DE PADRÕES ANALÍTICOS NECESSÁRIOS PARA DETERMINAÇÃO DE COVS EM LEITE.	49
APÊNDICE G – CONDIÇÕES DA METODOLOGIA ANALÍTICA	50
APÊNDICE H – CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS.....	51
APÊNDICE I – RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO DE VARREDURA.	52
APÊNDICE J – RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO.	53
APÊNDICE K – ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO PARA A SÉRIE DE ALCANOS SATURADOS.	54
APÊNDICE L – ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO PARA OS COVS IDENTIFICADOS NA AMOSTRA B.	55
APÊNDICE M – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE.....	56
APÊNDICE N – RESULTADOS DE ÁREA RELATIVA PARA AS 13 MARCAS DE LEITE ESTUDADAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de extrema importância no mundo, sendo consumido como base das dietas alimentares. Este alimento é composto majoritariamente por água, matéria gorda, caseína, albumina, lactose e sais minerais e orgânicos. O fato de ter a água como componente majoritário, faz com que a mesma seja a principal responsável por influenciar em características como textura, aparência, sabor e processos de deterioração química e microbiológica.

Com o passar dos anos, a produção de leite evoluiu rapidamente em diversos países, sendo que no período de 1995 a 2014, países como Vietnã, China e Tailândia apresentaram crescimento da produção leiteira entre 245 e 730%. Quando se trata de Brasil, o mesmo não pode ser considerado um dos países com maior crescimento comparativo, mas quando se observa seu crescimento de forma isolada, o mesmo cresceu mais de 100% durante o período, sendo responsável pela produção de 6% de leite produzido no mundo em 2014. Considerando a grande evolução na produção leiteira, processamentos que garantem a qualidade e durabilidade do mesmo se tornaram cada vez mais importantes. Processos que utilizam tratamentos térmicos, a frio ou a quente, foram criados e estabelecidos como os mais eficientes, já que à baixa temperatura ocorre inibição da multiplicação microbiana e, em altas temperaturas ocorre a interrupção da atividade vital dos germes.

Um dos processos mais utilizados na atualidade é o *UHT*, do inglês Ultra High Temperature. Este processo consiste em submeter o leite homogeneizado a uma alta temperatura por alguns segundos, sendo imediatamente resfriado. Contudo, os alimentos podem sofrer alterações significativas de sabor, quando submetidos a processos de aquecimento ou fermentação, além de contaminações provenientes dos diferentes equipamentos utilizados, acarretando em perdas de qualidade. Uma maneira de avaliar a qualidade do leite é submetê-lo a análises de determinação de Compostos Orgânicos Voltáteis (COVs), já que alguns defeitos de sabor e aroma podem ser observados no leite, como resultado da presença desta classe de compostos.

O presente estudo visa o desenvolvimento de metodologia utilizando *HS-SPME-GC-MS*, com a capacidade de determinar COVs de maneira rápida e eficiente, de forma a reduzir custos com gases de fase móvel, bem como aumentar a capacidade analítica, frente às metodologias utilizadas atualmente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite

2.1.1 Histórico do Leite

Historicamente, o consumo de leite e seus derivados eram raramente mencionados até o advento do século XX, que trouxe consigo uma redução das dificuldades de conservação e comércio. Análises da história da civilização indicam que o leite e seus subprodutos eram consumidos como base das dietas alimentares apenas por europeus e, como complemento, pelos egípcios. Além disso, relata-se que a população alemã, que tinha como hábito o consumo de leite, carne e queijo, era considerada como “bárbaros”, pois para os gregos e romanos, a “carne era proveniente de sacrifícios destinados aos deuses” (BENEDETTI, 2002).

Ao final do século XIX, com o início da Revolução Industrial, os consumidores europeus passaram a encarar o leite como um alimento para adultos e, desta maneira, o consumo de leite e seus derivados passou a aumentar. A partir de 1930, estimativas do consumo de leite em diversos países puderam ser realizadas e países como Suíça, Finlândia e Suécia estavam entre os maiores consumidores da época, ingerindo de 526 a 887 g de leite por habitante ao dia. Existem relatos, porém, de que até 1950, a produção leiteira no Brasil apresentava baixa produtividade do rebanho, diferentemente dos Estados Unidos, onde o leite representava 65% da renda bruta das fazendas na mesma época (BENEDETTI, 2002).

A produção de leite evoluiu rapidamente com o passar dos anos em diversos países, como pode ser observado na APÊNDICE A, tendo como maior destaque de crescimento a partir de 1995, países como Vietnã, China e Tailândia. O aumento expressivo de produção leiteira no Vietnã faz parte de uma iniciativa governamental através da criação do Plano Nacional de Desenvolvimento da Indústria Leiteira (do inglês *National Dairy Development Plan, NDDP*), reforçado pela Decisão do Governo nº. 167. O NDDP foi criado com o intuito de substituir as importações por produtos comercializados internamente, gerar emprego rural e aumentar os rendimentos das fazendas leiteiras (PHONG, 2009).

Com relação ao Brasil, observa-se no APÊNDICE A que, apesar de não fazer parte dos três países com maior crescimento na produção de leite, apresentou crescimento de mais de 100% durante o período avaliado, sendo responsável pela produção de 6% de leite no mundo em 2014.

Segundo a Pesquisa Agropecuária realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2016, a produção de leite no Brasil foi de 33.624 milhões de litros com 19,7 milhões de vacas ordenhadas, conforme mostra o APÊNDICE B. Desta forma, pode-se dizer que a média de produção é de 1.703 litros de leite/vaca ordenhada no ano.

2.1.2 Características do Leite

Segundo BEHMER (1977), o leite “é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado”, tendo como componentes principais: água (87,5%), matéria gorda (3,6%), caseína (3,0%), albumina (0,6%), lactose (4,6%) e sais minerais e orgânicos (0,7%).

A água é o componente principal do leite, já que constitui o maior percentual do mesmo, sendo essencial às características do produto por influenciar na textura, aparência, sabor e processos de deterioração química e microbiológica dos alimentos (BEHMER, 1977). Conforme descrito na literatura (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007), “quanto maior o teor de água de um alimento, maior é a sua sensibilidade à deterioração” e por isso, o leite é um produto tão sensível e necessita de cuidados na conservação.

A matéria gorda do leite encontra-se na forma de suspensão de glóbulos no líquido, sendo formada por uma mistura de triglicerídeos que diferem na sua composição de ácidos graxos, em termos de peso molecular e grau de insaturação, assim como para qualquer gordura alimentar (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007). A gordura do leite apresenta grande quantidade de ácidos graxos de cadeia curta (C4 a C10), como ácido butírico ou butanóico, capróico ou hexanóico, caprílico ou octanóico. Além disso, ácidos de cadeia longa como láurico ou dodecanóico, mirístico ou tetradecanóico, palmítico ou hexadecanóico e esteárico ou octadecanóico também podem ser encontrados neste tipo de gordura. Além destes ácidos graxos saturados, o leite é também constituído por alguns ácidos graxos insaturados em quantidades menores como: ácido caprolêico ou 9-decenóico e laurólêico ou 9-dodecenóico (BEHMER, 1977) e (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

A matéria gorda é o componente com maior possibilidade de variação no leite (1,5 a 7,0%), sendo ela a responsável pelas denominações de Integral, Padronizado, Semidesnatado e Desnatado, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Matéria gorda dos diferentes tipos de leite.

Tipo de Leite	Matéria Gorda
Leite Integral	Mínimo 3,0%
Padronizado	3,0%
Leite Semidesnatado	0,6 a 2,9%
Leite Desnatado	Máximo 0,5%

Fonte: adaptado de Instrução Normativa - 51, de 18 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Outros componentes principais do leite são as proteínas, em maior parte constituída pela caseína e albumina. A caseína forma uma solução coloidal, dando ao leite a cor esbranquiçada e opaca, sendo separada através de precipitação natural (fermentação) ou com auxílio de coalhos. Já a albumina, também chamada de lacto-albumina, é solúvel em água e coagula apenas pela ação de ácidos e calor (BEHMER, 1977).

Além disso, o leite possui sais minerais que representam uma pequena porcentagem da composição, e a lactose que está em quantidade um pouco maior e pertence ao grupo dos sacarídeos. A transformação da lactose ocorre naturalmente no leite, formando ácido láctico e, conseqüentemente, ocorre a precipitação da caseína e coagulação do leite (BEHMER, 1977).

2.1.3 Processos de Tratamento do Leite

Os processos de tratamento do leite têm por finalidade prolongar a conservação do mesmo através de tratamentos térmicos, a frio ou a quente, fazendo com que à baixa temperatura ocorra inibição da multiplicação microbiana, evitando-se assim a acidificação do meio e, à altas temperaturas ocorra a interrupção da atividade vital dos germes. Normalmente, após a ordenha do leite é realizado um resfriamento para conservação durante o transporte até a indústria, filtrado, submetido a tratamento à base de calor e novamente resfriado (BEHMER, 1977).

Atualmente o processo mais utilizado é o de ultrapasteurização, mais conhecido como *UHT*, do inglês *Ultra High Temperature*, ou UAT, sigla em português para Ultra Alta Temperatura. O processo *UHT* consiste em submeter o leite homogeneizado a uma temperatura de 130 °C, durante 2 a 4 segundos, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, sendo imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C (SOUZA, 2002).

Todo processo de tratamento do leite possui regulamentações específicas que determinam os parâmetros mínimos de qualidade do mesmo, sendo os parâmetros para o processo *UHT*, mostrados no APÊNDICE C.

O processamento do leite é muito importante para conservação do mesmo por um tempo prolongado, mas, assim como para diversos alimentos, o “sabor original dos materiais alimentares pode ser retido ou modificado, ou às vezes completamente alterado, especialmente por processos de aquecimento ou fermentação”, segundo DAVÍDEK, VELÍSEK & POKORNY (1990).

Em se tratando do leite, por possuir aroma e sabor muito leves, dificilmente é afetado pela absorção ou formação de características sensoriais indesejáveis, mas alguns “defeitos” de aroma e sabor podem ainda ser observados, conforme mostrado no APÊNDICE D.

Apesar do processamento do leite não ser propício à formação de aromas e sabores indesejáveis, assim como a formação dos “defeitos” de aroma e sabor, a atividade microbiana pode resultar em um sabor típico de produtos lácteos. Através das reações com microrganismos específicos partindo de lactose ou glicose, obtém-se piruvato (ou ácido pirúvico) e, seguido de outras reações, pode-se chegar a compostos como etanol, ácido acético e 2,3-butanodiol (APÊNDICE E).

2.2 Compostos Orgânicos Voláteis

Os COVs foram classificados em 1989 pelo World Health Organization (WHO), e foram definidos como todos os compostos apolares com ponto de ebulição entre 50 e 240 °C e todos os compostos polares com ponto de ebulição entre 100 e 260 °C. Desde então, a WHO atualiza constantemente a lista de compostos voláteis que devem ser monitorados no ar, já que para outras matrizes ainda não existe nenhuma legislação.

A análise química de compostos orgânicos voláteis é extremamente difundida na comunidade técnico-científica (CAPANEMA et al., 2016), já que, a emissão de alguns destes compostos ao ar, podem favorecer a formação de ozônio e, principalmente, de smog fotoquímico. A emissão destes poluentes ao ar livre deve ser monitorada devido ao seu alto impacto ambiental e, por isso, diversos países possuem regulamentação muito rigorosa para este controle. Além do monitoramento destes compostos no ar, muitas publicações científicas apresentam metodologias para determinação dos mesmos em matrizes de produtos comerciais e alimentos. Um exemplo são as metodologias descritas na literatura para a determinação de COVs em leite, já que estes compostos são conhecidos por serem responsáveis por defeitos de aroma e sabor no leite.

2.3 Delineamentos de Experimentos

A aplicação de análise multivariada para otimização de metodologias analíticas tem se tornado cada vez mais usual, já que detecta de maneira mais eficaz do que em procedimentos univariados, as interações entre as variáveis estudadas, bem como facilita a compreensão dos dados (MARTENDAL, 2007) e (LATTIN, CARROL e GREEN, 2011).

Dentro do contexto das análises multivariadas, um conceito muito importante é o de desenho de experimentos que pode ser descrito como a realização de “um conjunto de experiências representativas em relação a uma determinada questão” (ERIKSSON et al., 2008), sendo a forma mais clássica de definição do desenho experimental o planejamento de ponto

central. O desenho de experimentos apresenta três aplicações representativas de utilização e que serão detalhadas a seguir. (ERIKSSON et al., 2008)

1) Varredura: é utilizada como um procedimento inicial que tem por objetivo selecionar os fatores significativos ao sistema estudado através da modelagem de planejamento fatorial completo ou fracionado, bem como identificar os intervalos apropriados para otimização.

2) Otimização: é a etapa realizada após a varredura, que tem por objetivo prever as respostas para todas as combinações de variáveis incluídas nos experimentos e identificar o ponto ótimo entre as variáveis testadas.

3) Teste de Robustez: é a última etapa do desenho de experimentos e visa verificar a robustez do método utilizado referente às pequenas flutuações nos níveis das variáveis testadas.

Das etapas de um desenho de experimentos, pode se considerar que o planejamento fatorial completo em dois níveis é a base para todos os projetos experimentais clássicos de varredura, ou seja, é o desenho mais comum, onde avalia de forma preliminar a significância da variável dentro do sistema proposto (MARTENDAL, 2007) e (ERIKSSON et al., 2008).

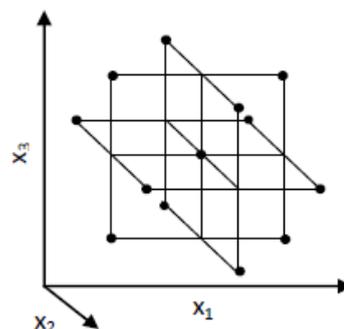
O número de ensaios de um planejamento fatorial completo em dois níveis é representado por 2^k , onde k é o número de variáveis, logo, a quantidade de experimentos aumenta com o aumento do número de variáveis que se deseja estudar. Em casos onde se pretende avaliar um número elevado de variáveis, é adequado utilizar um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{k-p} , onde p é um número inteiro que indica o quão fracionado será o experimento (MARTENDAL, 2007) e (ERIKSSON et al., 2008).

Quando se trata de otimização do experimento, diversos desenhos de metodologia de resposta podem ser utilizados, de acordo com as especificações de resposta e metodologia utilizadas como o desenho Composto Central Circunscrito com dois ou três fatores, Composto Central Centrado na Face com três fatores, Fatorial Completo de Três Níveis, Rechtschaffner, Box-Behnken, Doehlert, D-optimal, entre outros (ERIKSSON et al., 2008).

A fim de otimizar as condições para análise de compostos orgânicos voláteis via microextração em fase sólida – *SPME*, respeitando-se todas as etapas de um desenho de experimentos, utilizou-se o planejamento fatorial fracionado como etapa de varredura com o intuito de reduzir o número de experimentos para um elevado número de variáveis. Após a seleção das variáveis significativas, foi utilizado o desenho experimental Box-Behnken para otimização da metodologia. Este desenho experimental é extremamente utilizado em química analítica e, segundo GOMES (2013), é um planejamento rotacional “onde cada variável apresenta 3 níveis e os pontos experimentais estão distribuídos de forma equidistantes do ponto central”, tendo sua distribuição espacial dos pontos experimentais, representada na Figura 1.

Observa-se na Figura 1, que os experimentos estão localizados no ponto médio de cada extremidade do cubo. Os desenhos do Box-Behnken são úteis quando os experimentos nas extremidades são indesejáveis ou impossíveis e, principalmente, em metodologias para três ou quatro variáveis (ERIKSSON et al. 2008).

Figura 1 – Distribuição espacial dos pontos experimentais do desenho experimental Box-Behnken



Fonte: ERIKSSON et al. (2008).

O número de experimentos (N) do desenho experimental Box-Behnken pode ser descrito como $N = 2k(k - 1) + PC$, onde k é o número de variáveis e PC o número de pontos centrais, sendo que para este modelo existem apenas três níveis para cada variável, com a inclusão do ponto central, ou seja, o Box-Behnken apresenta como níveis o ponto central e mais dois pontos com distribuição equidistante deste ponto $(-1, 0, +1)$. Além de ser um método muito utilizado por gerar um número reduzido de experimentos, segundo GOMES (2013), é mais eficiente considerando-se a “razão entre o número de coeficientes gerados pelo número de experimentos executados”. Este método, porém, apresenta como desvantagem o fato de não testar condições extremas do tipo $(+1, +1, +1)$ e $(-1, -1, -1)$ (NOVAES et al., 2017).

As variáveis selecionadas para análise com desenho experimental foram: temperatura de incubação da fibra de *SPME* na amostra, tempo de incubação, tempo de extração dos analitos do *headspace*, temperatura e tempo de dessorção destes analitos no sistema de injeção. Estas variáveis foram selecionadas a fim de buscar condições que favorecessem uma redução de tempo do experimento, a fim de desenvolver uma metodologia para determinação de Compostos Orgânicos Voláteis.

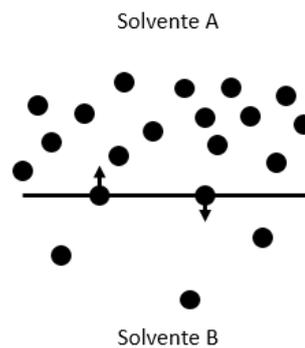
Para geração dos desenhos experimentais de cada etapa do estudo, análise dos dados obtidos através dos experimentos, geração dos gráficos e construção das superfícies de resposta, foi utilizado o software comercial MODDE registrada como *trademark* da MKS Umetrics AB.

2.4 Cromatografia

A separação cromatográfica de misturas é obtida por interação diferencial dos seus componentes em uma fase estacionária (líquida ou sólida) e uma fase móvel (líquida ou gasosa). As fases estacionárias possuem diferenciação de princípio de separação, de acordo com seu estado físico: fases estacionárias líquidas e sólidas (GOMIDE, 1988).

As fases estacionárias líquidas, normalmente suportadas em um sólido, realizam a separação dos compostos através de partição, que é um princípio de separação de componentes de uma mistura imiscível, baseado na diferença de solubilidade destes analitos nos dois líquidos. O equilíbrio do processo de partição pode ser estabelecido entre diferentes estados imiscíveis (líquido-líquido ou gás-líquido, por exemplo), desde que a concentração de moléculas de um soluto seja diferente nos diferentes estados (Figura 2) (GOMIDE, 1988).

Figura 2 – Representação de dois líquidos imiscíveis com concentração de soluto diferente nos dois solventes



Fonte: adaptado de RUTHVEN (1984).

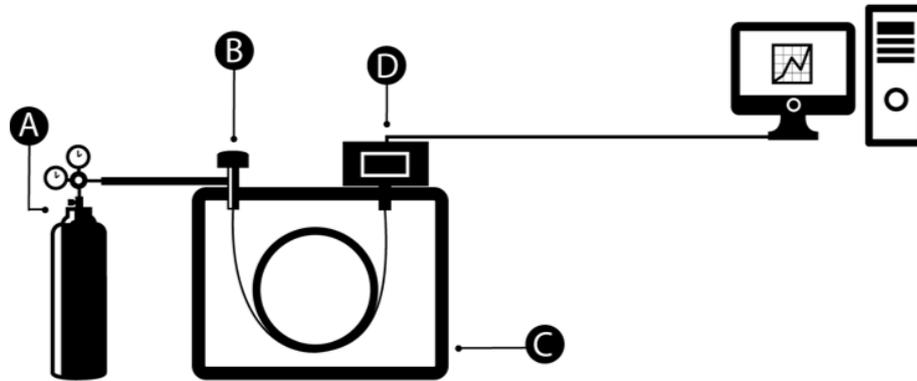
As fases estacionárias sólidas realizam a separação através do princípio da adsorção, que é um processo de transferência de massa, onde a fase sólida apresenta habilidade de reter determinadas substâncias, presentes na fase líquida ou gasosa, em sua superfície, permitindo a separação das mesmas (RUTHVEN, 1984). Este tipo de fenômeno pode ser físico ou químico, dependendo da natureza das forças ocorridas entre as moléculas e a fase sólida.

2.4.1 Cromatografia a Gás

A cromatografia a gás sofre um processo de separação por adsorção física, onde a interação entre as moléculas e a fase sólida é fraca, com interações do tipo Van der Waals ou eletrostáticas. Este tipo de técnica utiliza um gás inerte como fase móvel, sendo utilizada para

separação de compostos voláteis. Um cromatógrafo a gás é um equipamento muito mais complexo, conforme pode ser observado na Figura 3, a seguir.

Figura 3 – Esquema de um cromatógrafo a gás.



Fonte: Grupo de Química Analítica e Quimiometria (2015).

Conforme mostrado na Figura 3, um cromatógrafo a gás é composto por Sistema de Suprimento de Gases (A), Sistema de Injeção de Amostra (B), Coluna e Forno da Coluna (C), Sistema de Detecção (D) que gera o sinal que será visualizado no computador.

- Sistema de Suprimento de Gases: irá fornecer o gás de arraste, ou seja, a fase móvel;
- Sistema de Injeção de Amostra: introdução da amostra ao sistema;
- Coluna: suporte da fase estacionária;
- Forno da Coluna: sistema de aquecimento da coluna;
- Sistema de detecção: pode ser de diferentes tipos e irá detectar o analito, gerando um sinal que possa ser visualizado através do software adequado (DEL GRANDE, 2014).

Os principais tipos de detectores que podem ser utilizados em cromatografia a gás são:

- Detector por Ionização em Chama (do inglês *Flame Ionization Detector, FID*): detecta os íons formados através da queima da amostra em uma chama de hidrogênio e oxigênio.
- Detector por Condutividade Térmica (do inglês *Thermal Conductivity Detector, TCD*): detecta a variação na condutividade térmica do gás no momento da eluição do analito.

- Detector por Captura de Elétrons (do inglês *Electron Capture Detector, ECD*): detecta a supressão de um fluxo de elétrons termais (lentos), causada pela absorção por espécies eletrofilicas.

- Acoplamento à Espectrômetro de Massas (do inglês *Mass Spectrometry, MS*): detecta os analitos a partir de sua massa, após uma ionização que pode ser por impacto de elétrons ou química, que fará com que os analitos sejam separados através da sua relação massa carga (m/z).

A cromatografia a gás acoplada à espectrômetro de massas é uma técnica muito utilizada por combinar a alta seletividade e eficiência de separação da cromatografia, com a possibilidade de obtenção de informações estruturais e de massa molar dos compostos através da espectrometria de massas. Desta forma, a técnica de GC-MS é amplamente utilizada na identificação de substâncias voláteis e semivoláteis de amostras (CHIARADIA, COLLINS e JARDIM, 2008) e (SMITHS GROUP, 2014).

Quando se utiliza cromatografia com coluna capilar, que já possui compatibilidade suficiente ao sistema de vácuo do espectrômetro de massas, a separação das moléculas se dará inicialmente pela interação das mesmas com a fase estacionária da coluna, permitindo que o espectrômetro de massas “capture, ionize, acelere, desvie e detecte as moléculas ionizadas separadamente” (SMITHS GROUP, 2014).

Um espectrômetro de massas divide-se basicamente em cinco componentes: unidade de entrada da amostra, também conhecida por interface; fonte de ionização; analisador de massa; detector e sistema de dados, conforme mostra a Figura 4 (PAVIA et al., 2010).

Figura 4 – Componentes de um espectrômetro de massas.



Fonte: adaptado de PAVIA et al. (2010).

Os dois principais métodos de ionização em GC-MS são ionização por impacto de elétrons (do inglês *Electrons Impact*, *EI*) e ionização química (do inglês *Chemical Ionization*, *CI*). Na ionização por impacto de elétrons, utilizada neste estudo, o composto que está na fase gasosa após processo de separação cromatográfica chega à fonte de ionização e é bombardeado com elétrons em alta energia (70 eV), onde ocorre o desencadeamento de processo como remoção de um elétron da molécula. Como a remoção do elétron da molécula requer baixa energia, a energia excedente gera fragmentação da molécula ionizada, que será observada através das relações massa/carga (m/z) do espectro de massas (CHIARADIA, COLLINS e JARDIM, 2008).

Já a ionização química é uma técnica mais branda, que irá preservar o íon molecular do analito, por ser um processo de relativamente baixa energia não ocorre fragmentação. Neste tipo de ionização, as moléculas de interesse em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização e misturam-se a um gás reagente antes de serem bombardeadas por elétrons. O bombardeamento de elétrons neste caso não é capaz de gerar fragmentação das moléculas de analito, pois como o gás reagente está presente em maior proporção em relação às mesmas (1000:1), ele que sofre a ionização. Estas moléculas de gás reagente ionizadas reagem com as moléculas neutras do analito, gerando os íons pseudomoleculares (CHIARADIA, COLLINS e JARDIM, 2008).

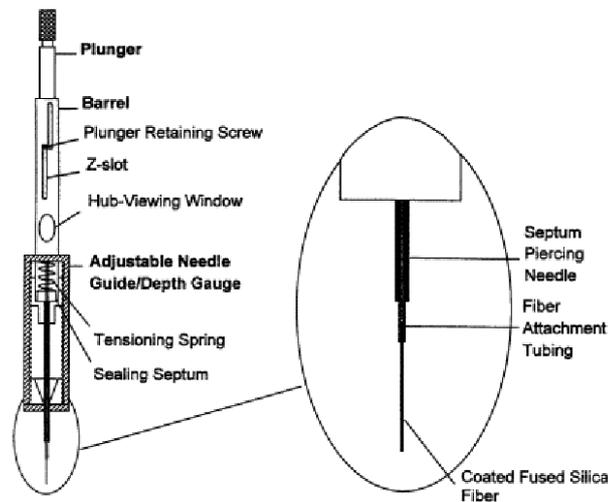
Com relação ao analisador de massa, existem diversos tipos como Analisador de Massa de Setor Magnético, Analisador de Massa de Foco Duplo, Analisador de Massa Quadrupolar e Analisador de Massa por Tempo de Voo. O analisador de massa mais comum e o utilizado neste estudo é o Analisador de Massa Quadrupolar, que é composto de “quatro barras sólidas paralelas na direção do feixe de íons” (PAVIA et al., 2010), onde suas barras recebem uma corrente contínua (CC) e radiofrequência (RF) aplicadas, gerando um campo eletrostático oscilante na região entre as mesmas. Os íons que entram no analisador adquirem uma oscilação neste campo eletrostático de acordo com a razão entre a amplitude da RF e a voltagem CC. Os íons passam então pelos eixos do quadrupolo com uma trajetória do tipo “saca rolhas”, atravessando o analisador para chegar ao detector (PAVIA et al., 2010).

2.4.2 Microextração em Fase Sólida

A microextração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Microextraction, SPME*) foi desenvolvida nos anos 1990, como um método de absorção de substâncias voláteis ou semivoláteis do espaço de cabeça (*headspace*) acima de amostras líquidas ou sólidas. Estes compostos absorvidos por este método podem ser diretamente introduzidos no injetor de um cromatógrafo à gás, a fim de ser dessorvido e separado por análise cromatográfica (SELF, 2005).

Com o passar dos anos e o desenvolvimento da metodologia, a técnica foi estendida à amostragem de líquido, podendo também ser introduzidos em cromatógrafo líquido de alta pressão (do inglês *High Pressure Liquid Chromatography, HPLC*). A absorção das substâncias voláteis pelo método de *SPME* ocorre através de uma fibra revestida com fase estacionária, conforme ilustrado na Figura 5.

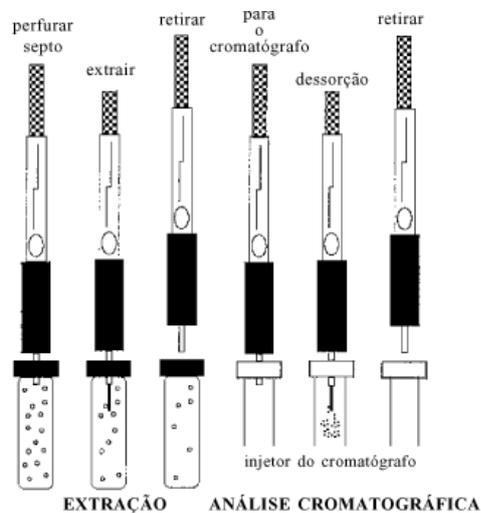
Figura 5 – Dispositivo de Absorção do *SPME*.



Fonte: SELF (2005).

A fibra de sílica fundida recoberta por fase estacionária específica é exposta no momento da amostragem para absorção dos analitos de interesse e, posteriormente, retraída para inserção no injetor do equipamento utilizado, conforme diagrama da Figura 6 (VALENTE e AUGUSTO, 2000). Esta metodologia é muito utilizada com detecção via espectrometria de massa, por ser um detector mais versátil, e pode ser tanto uma análise qualitativa, quanto quantitativa, desde que para esta última existam compostos conhecidos para realizar a calibração. A análise quantitativa só pode ser considerada confiável se apresentar reprodutibilidade e for utilizada padronização interna ou métodos de adição padrão (SELF, 2005).

Figura 6 – Diagrama de Exposição da Fibra de *SPME*.



Fonte: VALENTE & AUGUSTO (2000).

3 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

As metodologias de determinação de COVs em leite e seus derivados, através de cromatografia a gás são amplamente utilizadas. Alguns autores relatam a determinação de 11 COVs em leite *UHT* utilizando *cold trap* e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CONTARINI et al., 1997), onde 20 g de cada amostra que passou por processo UHT utilizando diferentes temperaturas foi suplementada com 1 mL de solução de metil-butanoano, onde os compostos foram volatilizados com nitrogênio gasoso e trapeados ao cromatógrafo. Nesta técnica observou-se que os tratamentos com aquecimentos mais severos apresentaram aumento de compostos orgânicos voláteis.

Outros autores realizaram a identificação através de microextração em fase sólida no headspace e cromatografia a gás com detecção por ionização em chama (*HS-SPME-GC-FID*) (PERKINS et al., 2005) e microextração em fase sólida no *headspace* e cromatografia a gás com detecção por ionização em chama e confirmação por espectrometria de massas (*HS-SPME-GC-FID/MS*) (MOUNCHILI et al., 2005). Nas análises acima mencionadas, foi utilizado 7 mL e 15 g de leite UHT em vial de headspace e identificou-se 17 e 19 COVs, respectivamente.

Além disso, processos que utilizam ultrassom de alta intensidade, são listados na bibliografia por identificarem 18 (RIENER et al., 2009) e 17 COVs (CHOULIARA et al., 2010) através de microextração em fase sólida no headspace e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (*HS-SPME-GC-MS*). Em ambos os casos se observou um aumento na concentração de COVs com o aumento do tempo de ultrassom.

Diversos estudos relatam a determinação de diferentes COVs, porém em sua grande maioria, as metodologias propostas realizam separação cromatográfica com tempo elevado, gerando uma redução em termos de produtividade e um aumento dos custos com gases de fase móvel.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia exploratória para determinação de compostos orgânicos voláteis em amostras de leite *UHT*, utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas e microextração em fase sólida no *headspace*.

4.2 Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia rápida, do tipo *FAST GC*, utilizando coluna cromatográfica de comprimento e diâmetro menores que os convencionais, com espessura de filme maior que o convencional;
- Utilizar Planejamento Fatorial Fracionado com Ponto Central para delinear os experimentos a serem realizados considerando as variáveis de relevância para *SPME*;
- Utilizar a Superfície de Resposta do tipo *Box Behnken* como metodologia de otimização das condições de *SPME*;
- Realizar levantamento das diferentes marcas de leite *UHT* disponíveis no mercado;
- Definir os compostos a serem monitorados nas amostras de leite;
- Determinar os compostos orgânicos voláteis em amostras selecionadas, visando avaliar a qualidade do leite com relação a presença de compostos de classes químicas definidas.

5 METODOLOGIA

O desenvolvimento de uma metodologia analítica requer alto investimento, já que é necessária aquisição de padrões analíticos para confirmação e quantificação dos compostos presentes nas amostras. No APÊNDICE F, estão relacionados os valores dos padrões analíticos grau cromatográfico, necessários para a determinação de 27 compostos orgânicos voláteis, identificados através desta metodologia. Observa-se, portanto, que a necessidade de investimento é de mais de R\$10.000,00 para os 27 padrões analíticos de COVs identificados através desta metodologia, por isso, é muito importante a realização de uma avaliação da viabilidade técnica da metodologia antes do investimento. Desta forma, o presente estudo prevê o desenvolvimento de uma metodologia exploratória, com a finalidade de avaliar se o método é eficiente para a determinação dos compostos desejados.

A metodologia foi desenvolvida em duas etapas: otimização das condições de *SPME*, através de delineamento de experimentos e, avaliação da viabilidade da metodologia para determinação de compostos orgânicos voláteis em matriz de leite *UHT*. A primeira etapa, relativa às condições de *SPME*, foi realizada utilizando-se uma amostra de leite *UHT* comercial da marca A, com a qual se realizou um planejamento experimental do tipo varredura, a fim de obterem-se as variáveis de relevância significativa e proceder ao planejamento de otimização para um menor número de variáveis.

No estudo do planejamento experimental do tipo varredura, foi utilizado o Planejamento Fatorial Fracionado com Ponto Central, onde se selecionou como variáveis de estudo: quantidade de cloreto de sódio para promoção do efeito *Salting-out*, temperatura de incubação/extração da amostra, tempo de incubação, tempo de extração, temperatura de dessorção e tempo de dessorção. A seleção destas variáveis foi realizada devido à presença de maior divergência de valores entre as metodologias relatadas na literatura.

O efeito *Salting-out* é importante por reduzir a pressão de vapor dos analitos quando se adiciona um eletrólito forte (NaCl) à uma mistura não eletrolítica. Esta alteração do equilíbrio de fases é mais intensa à medida que se aumenta a concentração do sal e faz com que os analitos presentes no líquido sejam transferidos à fase gasosa (headspace). Assim como o efeito *Salting-out*, a utilização de temperaturas mais altas nos processos de incubação/extração e dessorção alteram o equilíbrio de fases.

Como o estudo prevê uma otimização de parâmetros de maneira a maximizar as respostas de todos os analitos avaliados, independente da classe química a qual pertence, a avaliação das respostas obtidas foi realizada através de somatório de área dos 27 compostos identificados na amostra da marca A. Com estes resultados foi realizado o Planejamento

Fatorial Fracionado com Ponto Central, selecionando-se para a etapa de otimização, as variáveis definidas como de maior relevância sobre a resposta das amostras.

Após o experimento de varredura, foram realizados experimentos de otimização do tipo *Box Behnken* e de robustez da metodologia de *SPME*, utilizando como base de resposta a soma das áreas dos compostos orgânicos voláteis presentes na amostra. Com os parâmetros de *SPME* definidos, foi realizada a segunda etapa, de avaliação da viabilidade da metodologia, através da determinação dos parâmetros de repetitividade e reprodutibilidade. Para a medição destes parâmetros, foi feita primeiramente a análise de leite de 13 diferentes marcas, a fim de buscar a marca com presença de maior número de compostos orgânicos voláteis, de forma a enriquecer a avaliação de viabilidade.

Foi selecionado então, a marca B contendo a maior diversidade de compostos, para ser analisada em triplicata durante 7 dias, onde se utilizou as medidas de área do pico para cálculo de desvio padrão e coeficiente de variação, através do software Microsoft Excel.

5.1 Preparo da Amostra

O preparo da amostra foi realizado através da pesagem de $2,0050 \pm 0,0050$ g de Cloreto de Sódio (NaCl) em *vial* de *headspace* de 20 ml com tampa de rosca, seguido de adição de 10,00 ml da amostra de leite *UHT* em temperatura de, aproximadamente, 13 °C. A este vial, foram adicionados 5 µL de uma solução de ciclopentanona com concentração de 20,49 mg/ml. O frasco foi fechado, a amostra agitada manualmente por 10 segundos, sendo imediatamente analisada via HS-*SPME-GC-MS*. No APÊNDICE G estão dispostas as condições utilizadas na metodologia analítica.

A solução de ciclopentanona foi adicionada às amostras a fim de se controlar as variações do processo como alteração de tempo de retenção e de área. A concentração final da solução na amostra foi de 10,2 mg/L.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Desenhos Experimentais: Planejamento de Ponto Central

A fim de otimizar as melhores condições de *SPME* utilizadas na metodologia proposta, foi realizado o desenho experimental contendo as etapas de varredura, otimização e robustez e, portanto, três experimentos foram realizados. As variáveis estudadas foram: quantidade de NaCl para produção do efeito *salting-out*, temperatura e tempo de incubação, tempo de extração e temperatura e tempo de dessorção. Na Tabela 2 encontram-se as seis variáveis estudadas em três diferentes níveis para o experimento de varredura.

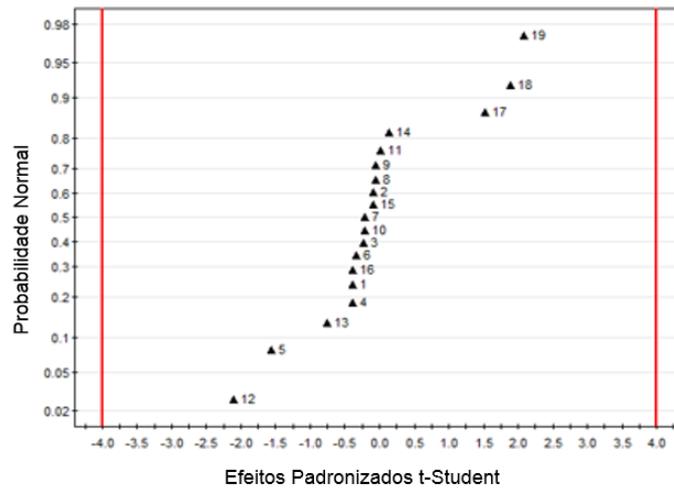
Tabela 2 – Variáveis e Níveis do Experimento de Varredura

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Quantidade de NaCl (g) (X ₁)	0	1	2
Temperatura de incubação (°C) (X ₂)	40	50	60
Tempo de incubação (min.) (X ₃)	5	10	15
Tempo de extração (min.) (X ₄)	10	20	30
Temperatura de dessorção (°C) (X ₅)	230	250	270
Tempo de dessorção (min.) (X ₆)	2	7	12

Fonte: autor.

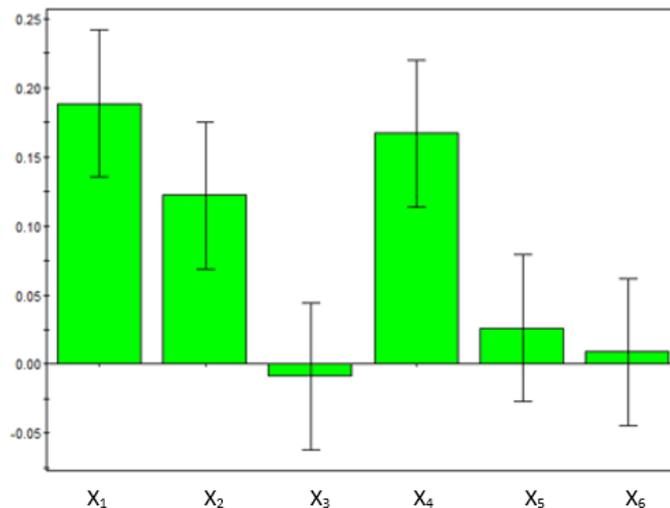
No APÊNDICE H, está apresentado um cromatograma de íons totais da amostra utilizada neste experimento, bem como o espectro de massas do analito 2-heptanona. Além disso, no APÊNDICE I encontram-se os resultados obtidos para cada um dos dezenove ensaios realizados durante o experimento de varredura, com as variáveis e respectivos níveis de cada uma. A Figura 7 mostra o gráfico de probabilidade normal para o experimento de varredura. A Figura 8 mostra o gráfico de significância do modelo, após aplicação de correção logarítmica, do tipo 10 Log (Y).

Figura 7 – Probabilidade Normal obtido para o Experimento de Varredura.



Fonte: adaptado do Software MODDE.

Figura 8 – Significância do Modelo para o Experimento de Varredura.



Fonte: adaptado do Software MODDE.

A Figura 7, mostra os resíduos das respostas *versus* a probabilidade normal de distribuição. O resultado ideal para este tipo de gráfico é quando se obtêm todos os pontos em linha reta na diagonal, indicando que os resíduos são normalmente distribuídos. Além disso, é importante avaliar se não existem pontos localizados fora das linhas vermelhas, indicando presença de *outliers*, ou seja, pontos que apresentaram alguma característica não prevista e que devem ser verificados. Nesta mesma Figura 7, quando se observa um padrão de curvatura, indica relações quadráticas não modeladas, já que se trata de um modelo linear, ou transformações incorretas das respostas. Obteve-se como parâmetro da Figura 7, o $R^2 = 0,918$ e o $Q^2 = 0,856$, sendo R^2 o coeficiente de ajuste do modelo idealmente próximo a 1,000 e o Q^2

que indica a precisão de uma futura predição, sendo o ideal quanto mais próximo ao valor de R^2 . Através de análise do gráfico e dos parâmetros R^2 e Q^2 considerou-se o modelo eficiente para o experimento proposto.

Como podem ser observadas na Figura 8, as variáveis que apresentaram maior significância foram X_1 , X_2 e X_4 , ou seja, quantidade de NaCl, temperatura de incubação e tempo de extração. Neste tipo de gráfico da Figura 8, leva-se em consideração que as variáveis com desvio que engloba o zero (0,00), representado pelas linhas pretas verticais, são variáveis de baixa ou nula significância para os resultados. Portanto, para o experimento de otimização, as variáveis que não apresentaram significância (X_3 , X_5 e X_6 , respectivamente identificadas por Tempo de Incubação, Temperatura e Tempo de Dessorção) foram mantidas constantes.

Na Tabela 3 estão representados os diferentes níveis utilizados para as variáveis que apresentaram maior significância no experimento de otimização, X_1 , X_2 e X_4 , bem como os valores fixados para as variáveis que não apresentaram significância, X_3 , X_5 e X_6 .

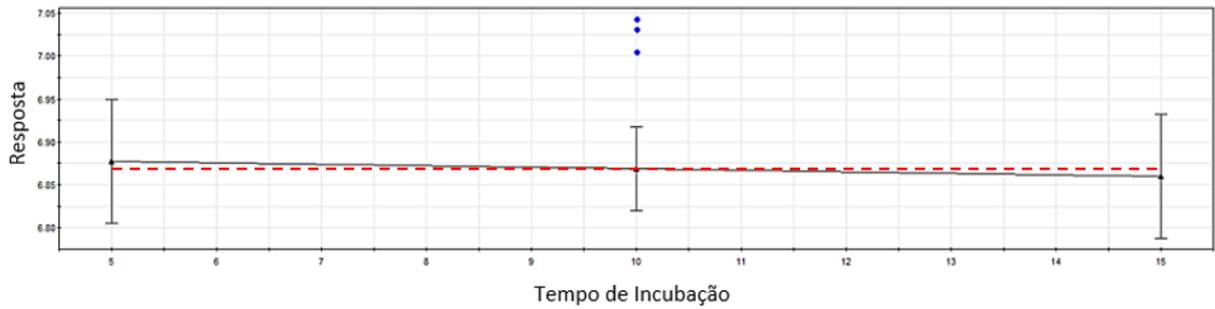
Tabela 3 – Variáveis e Níveis do Experimento de Otimização

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Quantidade de NaCl (g) (X_1)	0	1	2
Temperatura de incubação (°C) (X_2)	40	50	60
Tempo de incubação (min.) (X_3)	-	5	-
Tempo de extração (min.) (X_4)	10	20	30
Temperatura de dessorção (°C) (X_5)	-	250	-
Tempo de dessorção (min.) (X_6)	-	5	-

Fonte: autor.

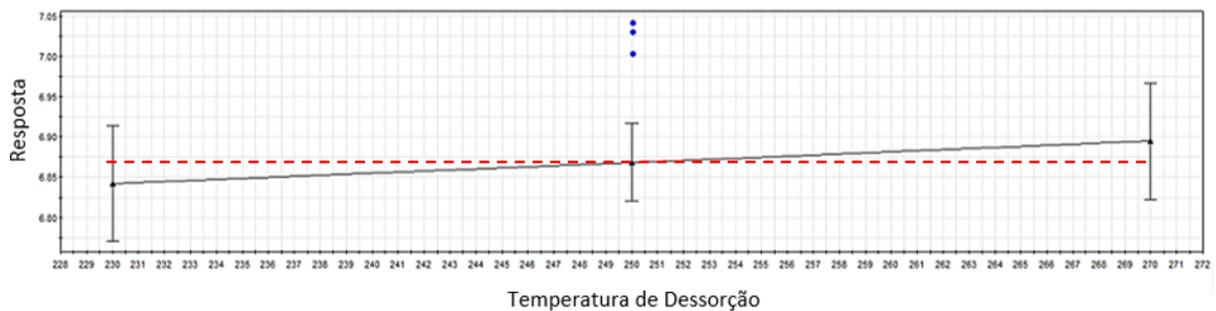
Os valores constantes escolhidos para as variáveis X_3 , X_5 e X_6 levaram em consideração os efeitos principais gerados pelas respostas do experimento de varredura, conforme pode ser observado nas Figura 9, Figura 10 e Figura 11.

Figura 9 – Efeitos Principais da Variável X₃ (Tempo de Incubação).



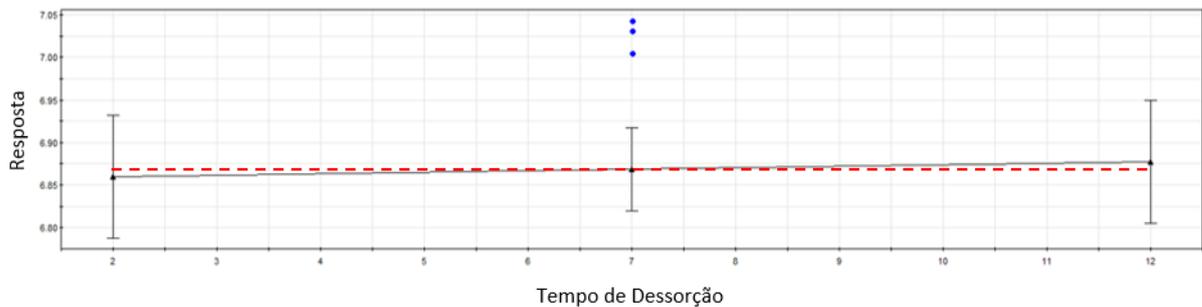
Fonte: adaptado do Software MODDE.

Figura 10 – Efeitos Principais da Variável X₅ (Temperatura de Dessorção).



Fonte: adaptado do Software MODDE.

Figura 11 – Efeitos Principais da Variável X₆ (Tempo de Dessorção).



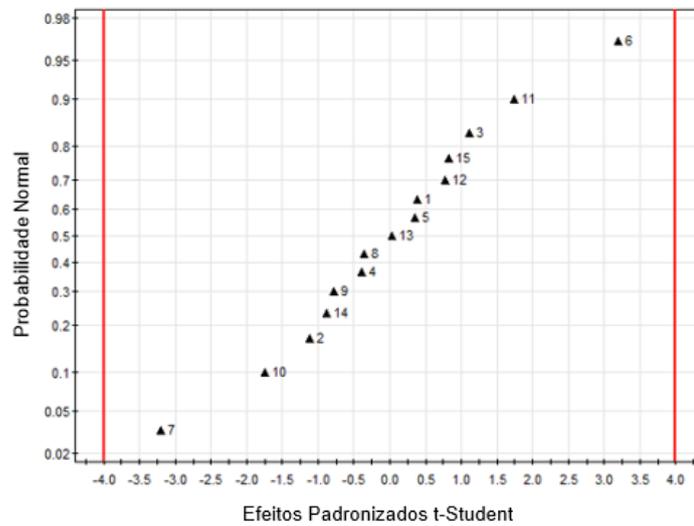
Fonte: adaptado do Software MODDE.

Na Figura 9, observa-se um leve aumento na resposta quando se utiliza um menor tempo de incubação, neste caso 5 minutos. Já na Figura 10, observa-se uma maior tendência de aumento de resposta com o aumento da temperatura, porém como a diferença não é significativa foi utilizada a temperatura de 250 °C, a fim de se reduzir possíveis decomposições de analitos no injetor. Na Figura 11, é observado um pequeno aumento de resposta com o aumento do tempo de dessorção, mas como a diferença não é significativa foi utilizado o tempo de 5 minutos, a

fim de reduzir gastos desnecessários com gás de fase móvel que é consumido com o aumento do tempo de dessorção.

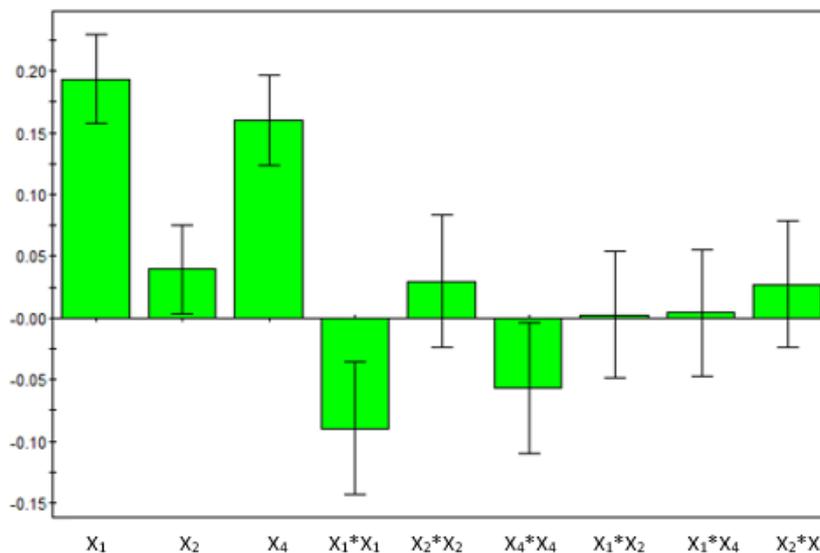
No APÊNDICE J, estão os resultados obtidos para cada um dos quinze ensaios realizados durante o experimento de otimização, com as variáveis e respectivos níveis de cada uma. A Figura 12 mostra o gráfico de probabilidade normal para o experimento e a Figura 13 mostra o gráfico de significância do modelo, após aplicação de correção logarítmica, do tipo 10 Log (Y).

Figura 12 – Probabilidade Normal do Experimento de Otimização.



Fonte: adaptado do Software MODDE.

Figura 13 – Significância do Modelo para o Experimento de Otimização.



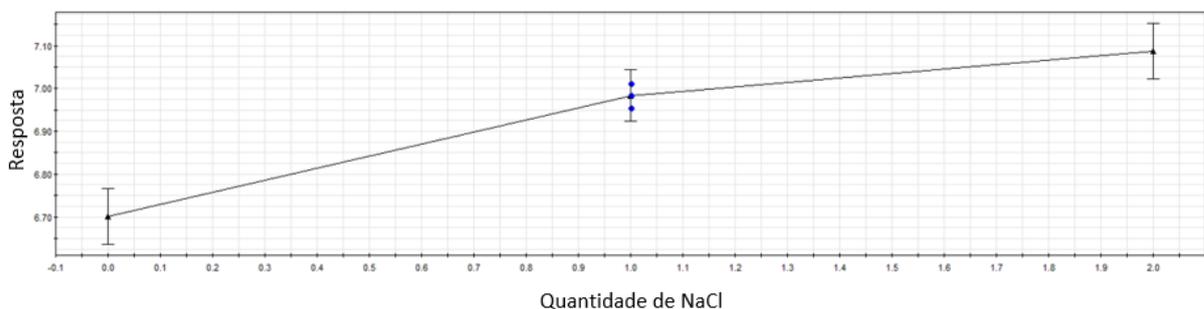
Fonte: adaptado do Software MODDE.

A Figura 12, mostra os resíduos das respostas versus a probabilidade normal de distribuição. Pode ser observado na Figura 12, que todos os pontos estão em linha reta na diagonal, que é o resultado ideal para este tipo de gráfico, indicando que os resíduos estão normalmente distribuídos. Obteve-se como parâmetros da Figura 12, o $R^2 = 0,986$ e o $Q^2 = 0,817$, sendo R^2 o coeficiente de ajuste do modelo idealmente próximo a 1,000 e o Q^2 que indica a precisão de uma futura predição, sendo o ideal quanto mais próximo ao valor de R^2 . Através de análise do gráfico e dos parâmetros R^2 e Q^2 considerou-se o modelo eficiente para o experimento proposto.

A Figura 13 mostra as variáveis analisadas (X_1 , X_2 e X_4), bem como as variáveis de interação entre as mesmas ($X_1 * X_1$, $X_2 * X_2$, $X_4 * X_4$, $X_1 * X_2$, $X_1 * X_4$ e $X_2 * X_4$). Considerando-se, portanto, que se as variáveis com desvio que engloba o zero (0,00), representado pelas linhas pretas verticais, são variáveis de baixa ou nula significância para os resultados, as variáveis significativas neste caso são X_1 , X_2 , X_4 , $X_1 * X_1$ e $X_4 * X_4$. A alta significância destas variáveis de interação ($X_1 * X_1$ e $X_4 * X_4$) reforça que as variáveis X_1 e X_4 têm maior significância quando comparadas à variável X_2 .

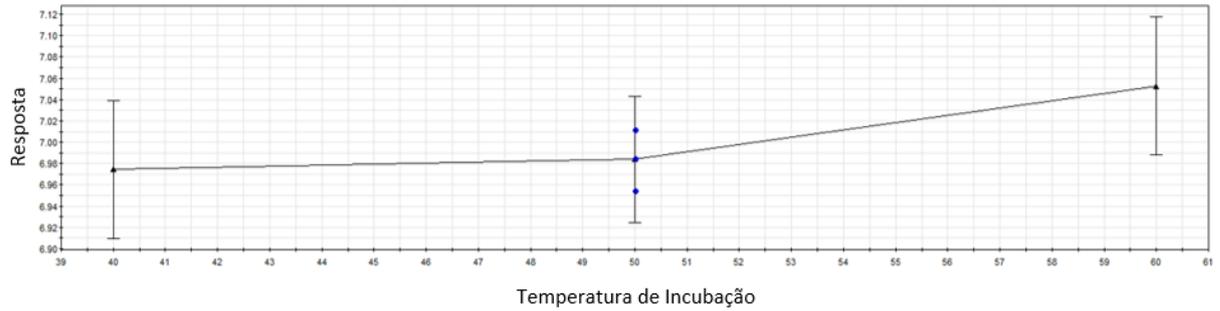
Na Figura 14, observa-se um aumento na resposta quando se utiliza uma maior concentração de sal. Da mesma forma, na Figura 15 observa-se uma maior resposta com o aumento da temperatura de incubação. Na Figura 16 também se observa um aumento de resposta com o aumento do tempo de extração. Portanto, com base nas respostas destes gráficos representados pelas Figura 14, Figura 15 e Figura 16, foram definidas como condições ótimas 2 g de NaCl, 60 °C para incubação e 30 minutos de extração, respectivamente.

Figura 14 – Efeitos Principais da Variável X_1 (Quantidade de NaCl).



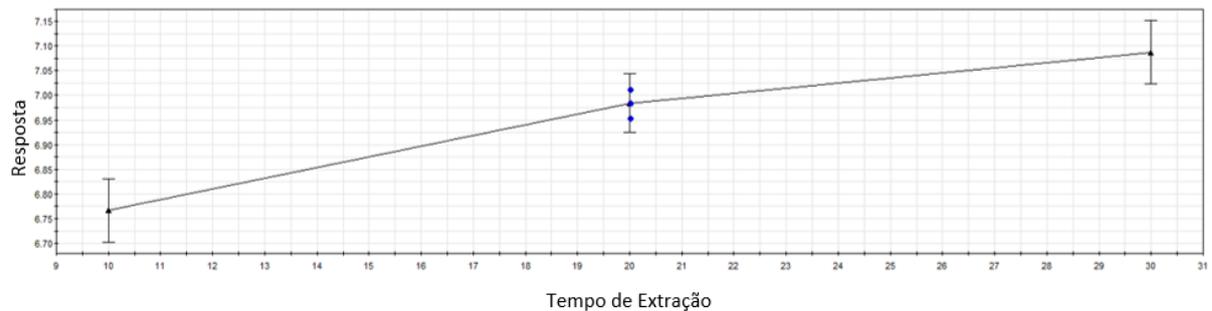
Fonte: adaptado do Software MODDE.

Figura 15 – Efeitos Principais da Variável X₂ (Temperatura de Incubação).



Fonte: adaptado do Software MODDE.

Figura 16 – Efeitos Principais da Variável X₄ (Tempo de Extração).



Fonte: adaptado do Software MODDE.

Após a realização do experimento de otimização e definição das melhores condições para análise via *SPME*, conforme mostrado na Tabela 4, foi realizado o teste de robustez da metodologia com cinco replicatas nas mesmas condições.

Tabela 4 – Condições otimizadas para *SPME*.

Variáveis	Condições
Quantidade NaCl (g) (X ₁)	2
Temperatura Incubação (°C) (X ₂)	60
Tempo Incubação (min.) (X ₃)	5
Tempo Extração (min.) (X ₄)	30
Temperatura Dessorção (°C) (X ₅)	250
Tempo Dessorção (min.) (X ₆)	5

Fonte: autor.

A Tabela 5, mostra os resultados de área obtidos, bem como o valor teórico e limites inferior e superior, estabelecidos através de predição pelo modelo de otimização do software MODDE. A predição é realizada com base nos resultados obtidos pelo experimento de otimização do tipo Box Behnken, onde o software relaciona as condições otimizadas com a resposta de área teórica que deveria ser gerada pelo conjunto das mesmas. Desta forma, obteve-se através do software o valor teórico de área para as condições ótimas, bem como os limites inferior e superior aceitáveis, considerando o desvio padrão obtido no experimento.

Tabela 5 – Resultados do Teste de Robustez e Predição

Ensaio	Área	Erro Relativo
Teórico	1,97E+07	0%
Limite Inferior	1,49E+07	-32%
Limite Superior	2,60E+07	24%
Replicata 1	2,03E+07	3%
Replicata 2	2,04E+07	4%
Replicata 3	2,10E+07	6%
Replicata 4	2,11E+07	7%
Replicata 5	2,08E+07	5%

Fonte: autor.

6.2 Avaliação da Viabilidade da Metodologia

Por se tratar de uma metodologia exploratória e não possuir padrões analíticos para os compostos de interesse foi realizada a avaliação de viabilidade de uma amostra da marca B, através da análise de três replicatas durante 7 dias. A totalidade de 21 replicatas foi analisada, onde os analitos foram identificados através do espectro de massas dado pela biblioteca do *National Institute of Standards and Technology (NIST)* e pelo Índice de *Kovats*, que foi calculado com base nas condições cromatográficas definidas.

Para utilização do Índice de *Kovats* (IK), uma série de alcanos saturados foi analisada no cromatógrafo a gás, por introdução líquida, utilizando-se as mesmas condições de rampa de aquecimento e fluxos da metodologia definida. Com o cromatograma da série de alcanos definiu-se o tempo de retenção de cada um dos compostos e realizou-se o cálculo do IK, segundo a Equação 1.

Equação 1

$$IK = \left[\frac{tr(\text{desc.}) - tr(n)}{tr(N) - tr(n)} \right] \times (100 \times z) + (100 \times n)$$

Onde tr(desc.) é o tempo de retenção do composto que se deseja calcular o IK, tr(n) é o tempo de retenção do alcano de menor número de átomos de carbono mais próximo ao composto desconhecido, tr(N) é o tempo de retenção do alcano de maior número de átomos de carbono mais próximo ao composto desconhecido, z é a diferença entre os números de átomos de carbono destes dois alcanos relacionados e n é o número de átomos de carbono do menor alcano mais próximo ao composto desconhecido. O APÊNDICE K mostra os valores de IK calculados para a série de alcanos saturados injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

Para os compostos desconhecidos, em que se deseja confirmar se a identificação realizada está correta, utilizou-se o mesmo cálculo da Equação 1, além de calcular o Erro Percentual (E %), conforme Equação 2, em relação ao IK teórico indicado na literatura (Royal Society of Chemistry s.d.). Os valores calculados podem ser observados no APÊNDICE L.

Equação 2

$$E (\%) = \frac{(\text{valor teórico} - \text{valor experimental})}{\text{valor teórico}} \times 100$$

Como pode ser observado no APÊNDICE L, o IK não pôde ser calculado para os 14 primeiros compostos, já que a série de alcanos disponível não contemplava alcanos saturados com quantidade de carbono menor que 10 unidades. Estes compostos foram identificados utilizando-se os espectros de massas comparativos da NIST. Para os demais compostos, nenhum apresentou IK calculado com erro superior a 2%, o que evidencia a eficiência da identificação dos analitos, bem como a viabilidade técnica da metodologia.

Os parâmetros de média, desvio padrão e coeficiente de variação (% CV), dos testes de repetitividade e reprodutibilidade, foram calculados através da área das amostras analisadas em triplicatas, durante 7 dias e são mostrados no APÊNDICE M. Como pode ser observado no APÊNDICE M, o coeficiente de variação para as 21 replicatas analisadas variou muito de composto para composto, sendo que para cada composto analisado, podem existir diferentes causas para o % CV ter apresentado valores fora do limite.

Conforme pode se observar para os compostos ácido acético, ácido butanóico, hexanal, heptanal, α -pineno, dodecano, ácido nonanóico, ácido dodecanóico e 2-pentadecanona, suas áreas médias apresentaram valor da ordem de 10^4 , bem mais baixa que os demais compostos. Esta área mais baixa pode ser o fator desencadeante para que o %CV fique maior, já que uma mínima volatilização em composto de baixa concentração é mais significativa do que em compostos com alta concentração.

Além disso, observa-se que para o Pentanal o %CV foi negativamente expressivo (80%), o que pode também ser explicado pelo fato de que este composto apresenta temperatura de ebulição mais baixa que a maioria dos demais compostos, indicando que talvez a metodologia não seja eficiente para aldeídos com baixa temperatura de ebulição.

6.3 Análise de diferentes amostras de leite

A fim de avaliar a presença dos analitos com viabilidade técnica para esta metodologia em diferentes marcas de leite, 11 marcas de leite *UHT*, conhecidos também como leites Longa Vida, e 2 marcas de leite fresco foram selecionadas para o estudo. Como não existe legislação específica com limites mínimos ou máximos de COVs em leite, não foi realizado nenhum comparativo com concentrações específicas, apenas uma análise de concentração relativa entre as amostras analisadas. No APÊNDICE N estão os resultados de área relativa obtidos comparativamente para todas as marcas selecionadas.

Conforme pode ser observada no APÊNDICE N, a amostra da marca K, apresentou alto teor de cetonas de maneira geral, assim como a amostra da marca A apresentou teor de aldeídos mais elevado. Além disso, pode-se observar que o teor de ácidos carboxílicos ficou mais acentuado nas amostras da marca B e da marca K. No entanto, as amostras de leite fresco das marcas L e M, apresentaram em geral um teor de COVs mais baixo ou muito próximo ao determinado nas demais amostras, com exceção dos compostos Limoneno e para-cimeno.

7 ANÁLISE DE CUSTOS E IMPACTO AMBIENTAL

7.1 Análise de Custos

O presente estudo foi realizado com o intuito de desenvolver uma metodologia de determinação de COVs em leite para um laboratório que já possui os equipamentos e materiais de consumo necessários, com exceção dos padrões analíticos grau cromatográfico.

Além disso, o principal objetivo do estudo é o desenvolvimento de uma metodologia mais rápida do que as metodologias já existentes. Portanto, não foi realizado um levantamento de custos da técnica, foi realizado um comparativo com relação à literatura (TUNICK, IANDOLA e VAN HEKKEN 2013), conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Comparativo entre as condições dos métodos

Descrição	TUNICK et al.	Presente Estudo
Cloreto de Sódio (g)	4	2
DVB/CAR/PDMS 50/30 μm	1	1
Quantidade de amostra (ml)	10	10
Temperatura Incubação ($^{\circ}\text{C}$)	40	60
Tempo Incubação (min.)	5	5
Temperatura Extração ($^{\circ}\text{C}$)	40	60
Tempo Extração (min.)	60	30
Temperatura Dessorção ($^{\circ}\text{C}$)	250	250
Tempo Dessorção (min.)	5	5
Temperatura Equilíbrio ($^{\circ}\text{C}$)	21	-
Tempo Equilíbrio (min.)	60	-
Coluna	DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μm)	DB-5 (10 m x 0,18 mm x 0,36 μm)
Fluxo (ml/min.) (Hélio)	0,6	0,5
Tempo de Corrida (min.)	23	16
Volume de Hélio Gasto (mL)	16,8	11
Tempo Total de Análise (min.)	153	56
Analitos Identificados	10	28

Fonte: autor

Como se pode observar na Tabela 6, a metodologia proposta no presente estudo indica a identificação de uma maior quantidade de analitos, utilizando-se um tempo total de análise

em torno de 60% menor do que na análise comparada. Além disto, este estudo prevê a utilização de 35% a menos de volume de gás de fase móvel, o que pode gerar uma redução de custos considerável quando se trata de análise de um número grande de amostras. Considerando que um cilindro de 8,5 m³ de gás Hélio 6.0, semelhante ao utilizado no desenvolvimento da metodologia, custa aproximadamente R\$1.500,00 e através de conversão de unidades, o mesmo contém em torno de 11,4 L de gás, pode-se dizer que para o preparo de 1000 replicatas de amostras, a economia com a utilização da metodologia proposta versa em torno de R\$763,00. Além do que, para a realização desta quantidade de replicatas na metodologia de TUNICK, IANDOLA & VAN HEKKEN (2013) seriam necessários no mínimo 2.550 horas, para a metodologia proposta seriam necessárias apenas 934 horas.

7.2 Impacto Ambiental

Com relação aos impactos ambientais, pode se considerar que a metodologia apresenta baixa impacto, já que como resíduos gera apenas as amostras de leite com baixa concentração de ciclopentanona que foi utilizada como padrão de controle e os septos de PTFE que não podem ser reaproveitados. Os frascos de headspace de vidro e as tampas podem ser lavados e reutilizados.

8 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos através da otimização das condições de SPME e da utilização de coluna cromatográfica de comprimento e diâmetro menores que os convencionais, com espessura de filme maior que o convencional, pode-se concluir que a metodologia proposta apresentou viabilidade técnica para identificar a maioria dos compostos orgânicos voláteis presentes nas amostras de leite.

A metodologia desenvolvida neste trabalho foi analisada comparativamente a uma metodologia reportada na literatura e foi observado que mesmo com identificação de uma maior quantidade de analitos, houve redução de 60% no tempo total de análise, possibilitando um aumento na capacidade analítica. Além disto, este estudo prevê a utilização de 35% a menos de volume de gás Hélio, o que pode gerar uma redução de custos considerável quando se trata de análise de um número de amostras elevado.

De forma geral, nos resultados obtidos para as amostras comerciais analisadas, foi observado que as amostras que não passaram pelo processo de ultrapasteurização (amostras de leite fresco), apresentaram teor de COVs menor do que as demais amostra e algumas amostras de leite UHT apresentaram teores diferenciados para as classes químicas analisadas. Como se tratam de marcas de leite com processamentos diferentes, específicos para cada uma de suas fábricas, pode-se dizer que as características de cada processo influenciam na formação de COVs ou na contaminação das amostras por eles.

A determinação de COVs em leite se mostrou extremamente importante quando se pretende avaliar a qualidade do leite frente a contaminações ou alterações de processo.

BIBLIOGRAFIA

- BEHMER, M. L. A. *Tecnologia do Leite: leite, manteiga, queijo, caseína, sorvetes e instalações; produção, industrialização, análise*. 7^a. São Paulo: Nobel, 1977.
- BENEDETTI, E. *Produção de Leite a Pasto: Boas Práticas*. Salvador: SEAGRI, 2002.
- CAPANEMA, M. A.; et al. “Principais metodologias de avaliação físico-química e olfatométrica de compostos orgânicos voláteis (COV) e odorantes – uma breve revisão.” *Research Gate*, 2016.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. “O Estado da Arte da Cromatografia Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos.” *Química Nova*, 2008: 623-636.
- CHOULIARA, E.; et al. “Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of raw, thermized and pasteurized milk.” *International Dairy Journal*, 2010.
- CONTARINI, G.; et al. “Influence of Heat Treatment on the Volatile Compounds of Milk.” *J. Agric. Food Chem.*, 1997: 3171-3177.
- DAVÍDEK, J.; VELÍSEK, J.; POKORNY, J. *Chemical Changes during Food Processing*. Czechoslovakia: Elsevier Science Publishers, 1990.
- DEL GRANDE, M. *Cromatografia Gasosa: Princípios Básicos*. Brasil: Embrapa, 2014.
- ERIKSSON, L.; et al. *Design of Experiments – Principles and Applications. Third revised and enlarged edition*. Sweden: Umetrics Academy, 2008.
- GOMES, S. V. F. “Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero Passiflora.” Salvador, 2013.
- GOMIDE, R. *Operações Unitárias: Operações de Transferência de Massa*. 1^a. Vol. 4. São Paulo: Dag Gráfica e Editora LTDA, 1988.
- Grupo de Química Analítica e Quimiometria. *Método alternativo analisa gordura trans de forma mais rápida e econômica*, 2015. <http://www.ufjf.br/secom/2015/01/29/metodo-alternativo-analisa-gordura-trans-de-forma-mais-rapida-e-economica/> (acesso em 10 de 2017).
- IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. s.d. <https://www.ibge.gov.br> (acesso em outubro de 2017).
- LATTIN, J. M.; CARROL, J. D.; GREEN, P. E. “Análise de Dados Multivariados (tradução Harue Avritscher).” *Cengage Learning*, 2011.

- MARTENDAL, E. “Aplicação De Planejamento Fatorial Fracionário E Boxbehnken Para Otimização de Extração com Microgota para Determinação de Tricloroanisol e Tribromoanisol de Amostras de Vinho por Cromatografia a Gás.” 2007.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. “Instrução Normativa - 51.” 18/09/2002.
- MOUNCHILI, A.; et al. “HS-SPME gas chromatographic characterization of volatile compounds in milk tainted with off-flavour.” *International Dairy Journal*, 2005.
- National Dairy Development Board. *National Dairy Development Board*. s.d. <http://nddb.coop/> (acesso em outubro de 2017).
- NOVAES, C. G.; et al. “Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo.” *Virtual Química*, 2017.
- PAVIA, D. L.; et al. *Introdução à Espectroscopia*. Estados Unidos: Cengage Learning, 2010.
- PERKINS, M. L.; et al. “Solid phase microextraction of stale flavour volatiles from the headspace of UHT milk.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005.
- PHONG, N. A. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 2009. www.fao.org/docrep/011/i0588e/I0588E11.htm (acesso em outubro de 2017).
- RIBEIRO, E. P; SERAVALLI, E. A. G. *Química de Alimentos*. 2ª. São Paulo: Blucher, 2007.
- RIENER, J.; et al. “Characterisation of volatile compounds generated in milk by high.” *International Dairy Journal*, 2009: 269–272.
- Royal Society of Chemistry. s.d. <http://www.chemspider.com/> (acesso em 12 de 2017).
- RUTHVEN, D. M. “Principles of adsorption and adsorption process.” *Wiley – Interscience Publication*, 1984: 1 – 13, 221 – 270.
- SELF, R. *Extraction of Organic Analytes From Foods: A Manual of Methods*. Cambridge: P. S. Belton, School of Chemical Sciences, University of East Anglia, 2005.
- Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich*. s.d. <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html> (acesso em 12 de 2017).
- SMITHS GROUP. *Smiths Detection*. 2014. <https://smithsdetection.com/> (acesso em dezembro de 2017).
- SOUZA, L. J. *Nova Legislação de Produtos Lácteos: Revisada, Ampliada e Comentada*. São Paulo: Revista Indústria de Laticínios, 2002.
- TUNICK, M. H.; IANDOLA, S. K.; VAN HEKKEN, D. L. “Comparison of SPME Methods for Determining Volatile Compounds in Milk, Cheese, and Whey Powder.” *foods*, 2013: 534-543.
- VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. “Microextração por fase sólida.” *Química Nova*, 2000.

**APÊNDICE A – PRODUÇÃO DE LEITE EM DIFERENTES PAÍSES, NO PERÍODO
DE 1995 A 2014.**

País	Produção de Leite (milhões de toneladas)					Crescimento
	1995	2000	2005	2010	2014	
Afganistão	1,37	1,66	1,73	1,72	1,77	29%
África do Sul	2,79	2,54	2,87	3,23	3,34	20%
Alemanha	28,63	28,35	28,49	29,63	32,43	13%
Argentina	8,77	10,12	9,91	10,63	11,01	26%
Austrália	8,46	10,85	10,13	9,02	9,54	13%
Bangladesh	1,99	2,14	2,62	3,40	3,70	86%
Brasil	17,13	20,53	25,53	30,86	35,28	106%
Canadá	7,92	8,16	7,81	8,24	8,40	6%
Chile	1,90	2,00	2,31	2,54	2,16	14%
China	9,48	12,37	32,02	41,16	42,58	349%
Dinamarca	4,68	4,72	4,58	4,91	5,19	11%
Estados Unidos	70,44	76,02	80,25	87,47	93,46	33%
Finlândia	2,47	2,45	2,43	2,34	2,40	-3%
França	26,09	25,74	25,71	24,25	26,20	0%
Índia	65,37	79,66	95,62	121,85	146,31	124%
Indonésia	0,73	0,79	0,85	1,31	1,21	66%
Irlanda	5,35	5,16	5,38	5,33	5,82	9%
Mauritânia	0,28	0,32	0,37	0,39	0,42	50%
México	7,54	9,44	10,03	10,84	11,29	50%
Nepal	1,01	1,17	1,35	1,58	1,79	77%
Noruega	1,93	1,74	1,59	1,58	1,58	-18%
Nova Zelândia	9,29	12,24	14,64	17,01	21,32	129%
Países Baixos	11,32	11,23	10,98	11,81	12,73	12%
Paquistão	19,01	25,57	29,44	35,49	50,14	164%
Polônia	11,64	11,89	11,95	12,30	13,00	12%
Reino Unido	14,84	14,49	14,47	14,07	15,05	1%
Romênia	5,02	4,62	5,55	5,06	5,21	4%
Rússia	39,31	32,28	31,15	31,84	30,76	-22%
Sri Lanka	0,29	0,16	0,17	0,21	0,25	-14%
Suécia	3,30	3,35	3,21	2,90	2,97	-10%
Suíça	3,93	3,91	3,96	4,11	4,10	4%
Tailândia	0,31	0,52	0,89	0,91	1,07	245%
Vietnã	0,07	0,10	0,23	0,34	0,58	729%

Fonte: National Dairy Development Board.

**APÊNDICE B - PRODUÇÃO DE LEITE E VACAS ORDENHADAS POR ESTADO
BRASILEIRO**

Brasil, Grande Região e Estado	Vacas ordenhadas (Cabeças)	Produção de Leite (Mil litros)	Valor da produção (Mil Reais)
Brasil	19678817	33624653	39441516
Norte	2084186	1876004	1709393
Rondônia	600065	790947	592001
Acre	81284	56870	60550
Amazonas	97104	45978	69747
Roraima	37919	13141	23654
Pará	732936	577522	583596
Amapá	6777	5983	10653
Tocantins	528101	385563	369191
Nordeste	3505866	3772384	4919050
Maranhão	591520	371250	434866
Piauí	129366	73518	152717
Ceará	534479	528138	742901
Rio Grande do Norte	247758	227747	372230
Paraíba	222832	178437	242636
Pernambuco	488780	839029	1103292
Alagoas	192181	337974	441453
Sergipe	218744	357882	435843
Bahia	880206	858408	993112
Sudeste	6819765	11546087	13936462
Minas Gerais	4974449	8970779	10803365
Espírito Santo	272908	371375	410771
Rio de Janeiro	415509	511865	578541
São Paulo	1156899	1692068	2143785
Sul	4200266	12457744	14736537
Paraná	1621957	4730195	5838834
Santa Catarina	1116994	3113769	3672024
Rio Grande do Sul	1461315	4613780	5225678
Centro-Oeste	3068734	3972434	4140075
Mato Grosso do Sul	258919	346300	331855
Mato Grosso	553100	662720	622792
Goiás	2237872	2933441	3153657
Distrito Federal	18843	29972	31771

Fonte: IBGE.

APÊNDICE C – PARÂMETROS MÍNIMOS DE QUALIDADE DO LEITE UHT.

Requisitos	Leite Integral	Leite Semidesnatado	Leite Desnatado	Métodos de Análises
Matéria gorda	Mínimo 3,0	0,6 a 2,9	Máximo 0,5	FIL 1C 1987
Acidez (g ác. Láctico/100 ml)	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18	AOAC 15ª ed., 947.05
Estabilidade a Etanol 68% (v/v)	Estável	Estável	Estável	FIL 48 1969
Extrato seco desengordurado (% m/m)	Mínimo 8,2	Mínimo 8,3	Mínimo 8,4	FIL 21B 1987

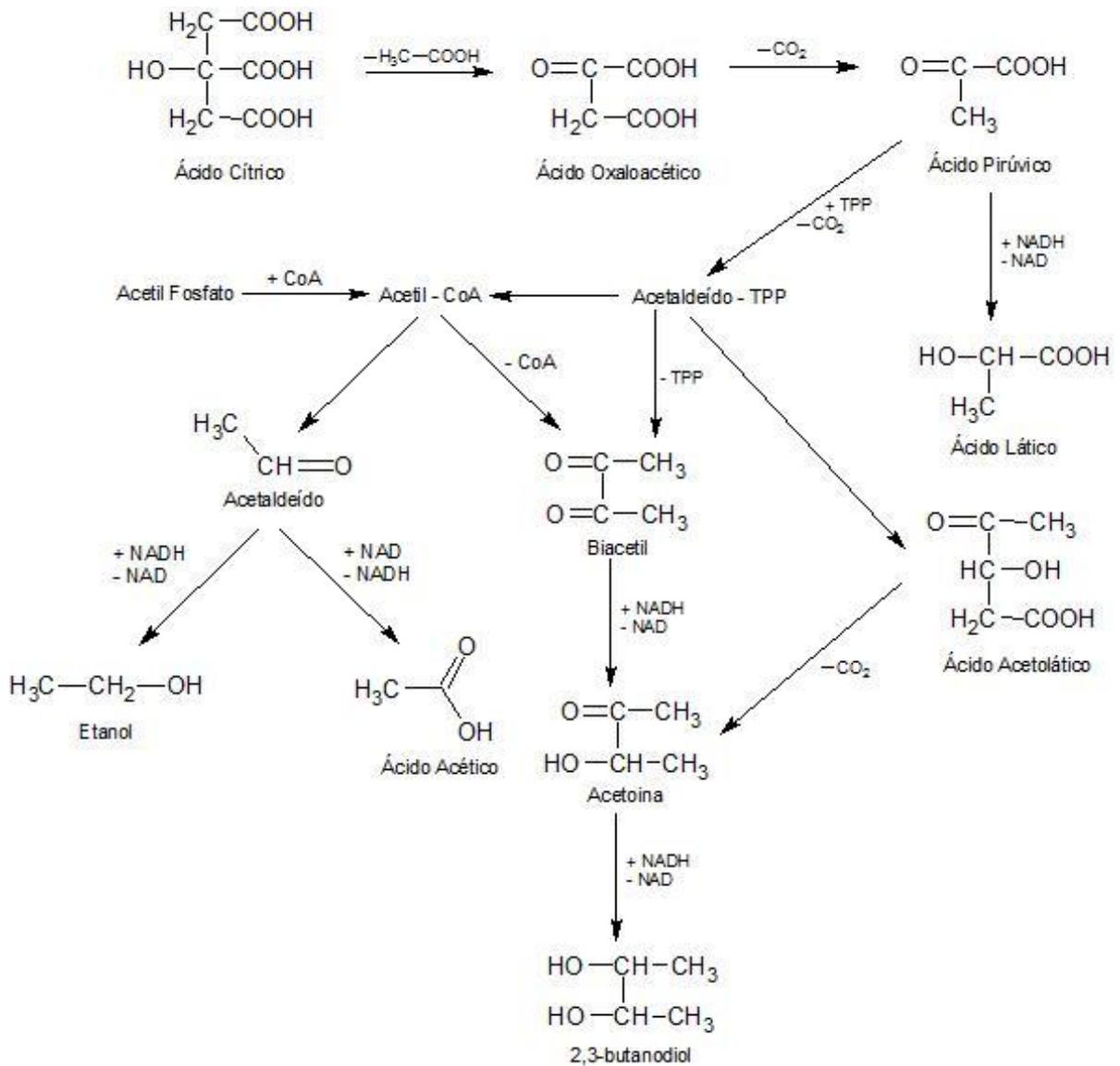
Fonte: SOUZA, 2002.

APÊNDICE D – DEFEITOS DE AROMA E SABOR EM LEITE.

Classe do Aroma ou Sabor Indesejável	Nota	Reações	Principais Tipos de Compostos
Aromas Alimentares	Erva	Transmitida (sem alteração)	Aldeídos, Compostos Sulfurados
	Ácido	Fermentação	Ácidos Voláteis
Microbiana	Maltado	Streptococcus lactis	Aldeídos Ramificados
	Frutado	Pseudomonas esterases	Ésteres (C4-C6)
Lipolisado	Putrefado	Microrganismos psicotrópicos	Produtos de proteólise e lipólise
	Rançoso	Hidrólise	Ácidos Graxos de cadeia curta
Curado	Vegetal Cozido	Destruição de compostos de enxofre	Tióis, Sulfeto de Hidrogênio e Metanotiol
	Caramelizado	Reações de Maillard	Maltol e Isomaltol
Ativado por luz	Luz solar	Destruição de metionina, oxidação lipídica	Metanotiol, Sulfeto e Dissulfeto de Dimetila, Alcenal, Alcadienal
	Oxidado		
Oxidado	Metálico	Oxidação lipídica	Aldeídos, Oct-1-em-3-one, 2,4,7-decatrinal, 2,6 e 3,6-nonadienal
	Aroma de Peixe	catalisada por cobre	
	Aroma de Pepino		

Fonte: DAVÍDEK, VELÍSEK & POKORNY, 1990.

APÊNDICE E – ROTA DO PIRUVATO COMO UM PRECURSOR DE AROMA EM LEITE E SUB-PRODUTOS.



Fonte: DAVÍDEK, VELÍSEK & POKORNY (1990).

**APÊNDICE F – CUSTO DE PADRÕES ANALÍTICOS NECESSÁRIOS PARA
DETERMINAÇÃO DE COVS EM LEITE.**

Composto	Valor Unitário
2-etil-hexanol	R\$ 150,00
2-etil-hexeno	R\$ 276,00
2-heptanona	R\$ 459,00
2-nonanona	R\$ 261,00
2-pentadecanona	R\$ 228,00
2-pentanona	R\$ 446,00
2-propanona	R\$ 810,00
2-tridecanona	R\$ 228,00
2-undecanona	R\$ 228,00
3-metil-2-pentanona	R\$ 636,00
Ácido Acético	R\$ 62,00
Ácido Butanóico	R\$ 489,00
Ácido Decanóico	R\$ 682,00
Ácido Dodecanóico	R\$ 668,00
Ácido Heptanóico	R\$ 258,00
Ácido Hexanóico	R\$ 734,00
Ácido Nonanóico	R\$ 489,00
Ácido Octanóico	R\$ 719,00
α -pineno	R\$ 265,00
Benzaldeído	R\$ 341,00
Dodecano	R\$ 346,00
Heptanal	R\$ 197,00
Hexanal	R\$ 192,00
Limoneno	R\$ 275,00
Nonanal	R\$ 328,00
p-Cimeno	R\$ 467,00
Pentanal	R\$ 192,00
TOTAL	R\$ 10.426,00

Fonte: Sigma-Aldrich.

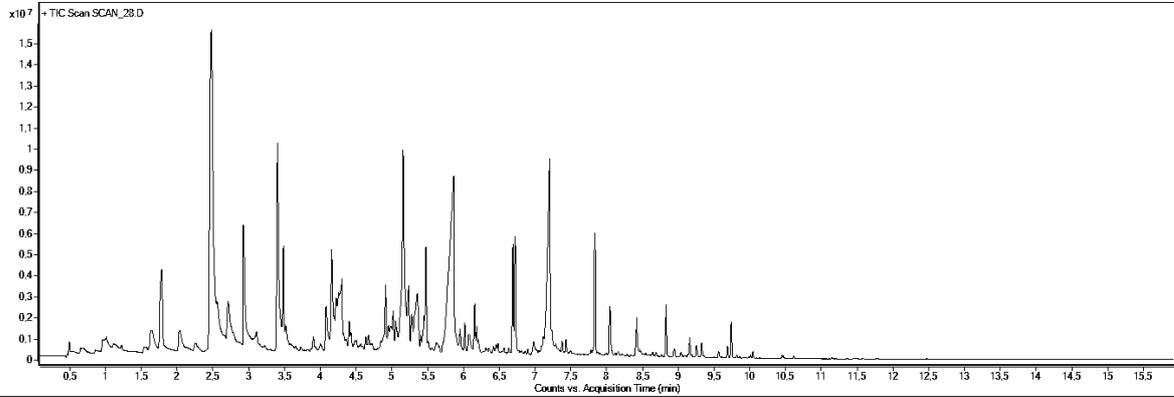
APÊNDICE G – CONDIÇÕES DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Condições SPME	
Fibra DVB/ CAR/PDMS	50/30 μm
Tempo de Incubação (min.)	5
Temperatura de Incubação ($^{\circ}\text{C}$)	60
Tempo de Extração da Amostra (min.)	30
Agitação durante Extração	<i>On</i>
Velocidade de Agitação (rpm)	250
Tempo de Dessorção da Amostra (min.)	5
Temperatura de Condicionamento Fibra ($^{\circ}\text{C}$)	270
Tempo de Pós-Condicionamento da Fibra (min.)	2
Condições GC	
Coluna DB-5MS (10 m x 0,18 mm x 0,36 μm)	
Temperatura Inicial Forno ($^{\circ}\text{C}$)	35
Tempo de Espera (min.)	1
Taxa de Aquecimento ($^{\circ}\text{C}/\text{min.}$)	20
Temperatura Final Forno ($^{\circ}\text{C}$)	250
Tempo de Espera (min.)	4,25
Fluxo Coluna (ml/min.)	0,5
Condições Injetor	
Modo <i>Splitless</i>	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	250
Fluxo Total (ml/min.)	6,5
Condições MS	
Temperatura Linha de Transferência ($^{\circ}\text{C}$)	270
Modo de Aquisição	<i>Scan</i>
Atraso Solvente (min.)	0
Massa Baixa	35
Massa Alta	250
Temperatura Fonte ($^{\circ}\text{C}$)	250
Temperatura Quadrupolo ($^{\circ}\text{C}$)	150

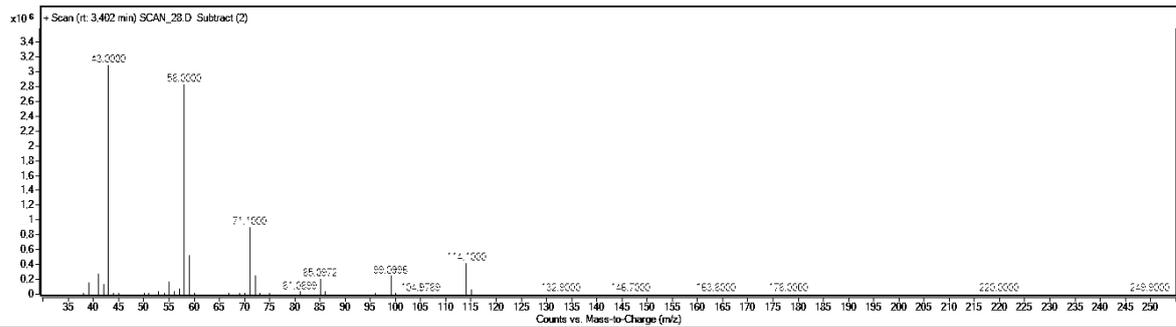
Fonte: autor.

APÊNDICE H – CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS.

- Cromatograma de Íons Totais:



- Espectro de Massas do analito 2-heptanona:



APÊNDICE I – RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO DE VARREDURA.

Ensaio	X₁	X₂	X₃	X₄	X₅	X₆	Resultado (Área)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2,16E+06
2	1	-1	-1	-1	1	-1	6,14E+06
3	-1	1	-1	-1	1	1	4,59E+06
4	1	1	-1	-1	-1	1	9,44E+06
5	-1	-1	1	-1	1	1	2,03E+06
6	1	-1	1	-1	-1	1	5,20E+06
7	-1	1	1	-1	-1	-1	3,76E+06
8	1	1	1	-1	1	-1	1,04E+07
9	-1	-1	-1	1	-1	1	5,15E+06
10	1	-1	-1	1	1	1	1,35E+07
11	-1	1	-1	1	1	-1	9,93E+06
12	1	1	-1	1	-1	-1	1,53E+07
13	-1	-1	1	1	1	-1	4,74E+06
14	1	-1	1	1	-1	-1	1,17E+07
15	-1	1	1	1	-1	1	8,64E+06
16	1	1	1	1	1	1	2,21E+07
17	0	0	0	0	0	0	1,01E+07
18	0	0	0	0	0	0	1,08E+07
19	0	0	0	0	0	0	1,10E+07

Fonte: autor.

APÊNDICE J – RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO.

Ensaio	X₁	X₂	X₃	X₄	X₅	X₆	Resultado (Área)
1	-1	-1	0	0	0	0	2,16E+06
2	1	-1	0	0	0	0	6,14E+06
3	-1	1	0	0	0	0	4,59E+06
4	1	1	0	0	0	0	9,44E+06
5	-1	0	0	-1	0	0	2,03E+06
6	1	0	0	-1	0	0	5,20E+06
7	-1	0	0	1	0	0	3,76E+06
8	1	0	0	1	0	0	1,04E+07
9	0	-1	0	-1	0	0	5,15E+06
10	0	1	0	-1	0	0	1,35E+07
11	0	-1	0	1	0	0	9,93E+06
12	0	1	0	1	0	0	1,53E+07
13	0	0	0	0	0	0	4,74E+06
14	0	0	0	0	0	0	1,17E+07
15	0	0	0	0	0	0	8,64E+06

Fonte: autor.

APÊNDICE K – ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO PARA A SÉRIE DE ALCANOS SATURADOS.

Tempo de Retenção (min.)	Composto	Número de Carbonos	IK Calculado
4,43	Decano	10	1000,0
5,25	Undecano	11	1102,5
6,04	Dodecano	12	1204,1
6,76	Tridecano	13	1302,8
7,45	Tetradecano	14	1402,6
8,10	Pentadecano	15	1502,5
8,71	Hexadecano	16	1603,2
9,29	Heptadecano	17	1702,6
9,84	Octadecano	18	1802,0
10,37	Nonadecano	19	1902,8
10,87	Eicosano	20	2002,1
11,35	Heneicosano	21	2101,8
11,81	Docosano	22	2195,2
12,32	Tricosano	23	2289,8
12,94	Tetracosano	24	2388,5
13,72	Pentacosano	25	2488,5
14,71	Hexacosano	26	2600,0

Fonte: autor.

**APÊNDICE L – ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO PARA OS COVS
IDENTIFICADOS NA AMOSTRA B.**

Tempo de Retenção (min.)	Composto	IK Teórico	IK Calculado	E %
0,667	2-propanona	502,0	-	-
0,994	3-metil-2-pentanona	752,0	-	-
1,2	Ácido Acético	619,0	-	-
1,549	2-pentanona	691,0	-	-
1,638	Pentanal	722,0	-	-
2,429	Ácido Butanóico	793,0	-	-
2,451	2-etilhexeno	785,0	-	-
2,525	Ciclopentanona	796,0	-	-
2,563	Hexanal	817,0	-	-
3,397	2-heptanona	894,0	-	-
3,518	Heptanal	907,0	-	-
3,837	Alfa-pineno	928,0	-	-
4,079	Benzaldeído	986,0	-	-
4,15	Ácido Hexanóico	985,0	-	-
4,636	2-etilhexanol	1028,0	1025,3	0%
4,636	para-Cimeno	1019,0	1025,3	-1%
4,682	Limoneno	1028,0	1030,9	0%
4,982	Ácido Heptanóico	1068,0	1067,2	0%
5,154	2-nonanona	1093,0	1088,0	0%
5,275	Nonanal	1110,0	1102,8	1%
5,776	Ácido Octanóico	1191,0	1166,5	2%
6,018	Dodecano	1204,0	1197,3	1%
6,457	Ácido Nonanóico	1281,0	1257,7	2%
6,688	2-undecanona	1293,0	1289,6	0%
7,155	Ácido Decanóico	1377,0	1357,3	1%
8,045	2-tridecanona	1505,0	1492,1	1%
8,404	Ácido Dodecanóico	1569,0	1549,9	1%
9,257	2-pentadecanona	1690,0	1694,0	0%

Fonte: autor.

APÊNDICE M – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE

Tempo de Ret. (min.)	Composto	Fórmula	Massa	PE (°C)	Área Média	Desvio Padrão	%CV
0,667	2-propanona	C ₃ H ₆ O	58,042	46,5±3,0	1,03E+06	1,83E+05	18%
0,994	3-metil-2-pentanona	C ₆ H ₁₂ O	100,089	116,5±8,0	2,64E+06	7,43E+05	28%
1,200	Ácido Acético	C ₂ H ₄ O ₂	60,021	117,1±3,0	6,80E+04	4,15E+04	61%
1,549	2-pentanona	C ₅ H ₁₀ O	86,073	102,7±3,0	8,20E+05	2,61E+05	32%
1,638	Pentanal	C ₅ H ₁₀ O	86,073	103,7±3,0	8,02E+05	6,45E+05	80%
2,429	Ácido Butanóico	C ₄ H ₈ O ₂	88,052	164,3±3,0	1,85E+05	8,50E+04	46%
2,451	2-etil-hexeno	C ₈ H ₁₆	112,125	117,7±7,0	1,24E+05	3,25E+04	26%
2,525	Ciclopentanona	C ₅ H ₈ O	84,058	130,5±8,0	2,46E+07	4,06E+06	17%
2,563	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100,089	127,9±3,0	1,93E+05	7,64E+04	40%
3,397	2-heptanona	C ₇ H ₁₄ O	114,104	151,2±3,0	7,40E+06	8,78E+05	12%
3,518	Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	114,104	150,4±3,0	1,19E+05	4,07E+04	34%
3,837	α-pineno	C ₁₀ H ₁₆	136,125	157,9±7,0	8,97E+03	3,04E+03	34%
4,079	Benzaldeído	C ₇ H ₆ O	106,042	178,7±0,0	1,10E+06	1,46E+05	13%
4,150	Ácido Hexanóico	C ₆ H ₁₂ O ₂	116,084	204,6±3,0	3,70E+06	1,05E+06	28%
4,636	2-etil-hexanol	C ₈ H ₁₈ O	130,136	184,6±0,0	1,96E+05	5,56E+04	28%
4,636	p-Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	134,110	173,9±10,0	6,70E+04	1,65E+04	25%
4,682	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	136,125	175,4±20,0	7,68E+04	2,12E+04	28%
4,982	Ácido Heptanóico	C ₇ H ₁₄ O ₂	130,099	222,6±3,0	7,53E+04	2,00E+04	27%
5,154	2-nonanona	C ₉ H ₁₈ O	142,136	193,5±3,0	2,86E+06	4,20E+05	15%
5,275	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142,136	190,8±3,0	1,17E+05	2,15E+04	18%
5,776	Ácido Octanóico	C ₈ H ₁₆ O ₂	144,115	239,3±3,0	5,92E+06	1,06E+06	18%
6,018	Dodecano	C ₁₂ H ₂₆	170,203	216,1±3,0	1,74E+05	7,78E+04	45%
6,457	Ácido Nonanóico	C ₉ H ₁₈ O ₂	158,131	254,9±3,0	4,88E+04	1,57E+04	32%
6,688	2-undecanona	C ₁₁ H ₂₂ O	170,167	230,8±3,0	1,09E+06	2,01E+05	18%
7,155	Ácido Decanóico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172,146	269,6±3,0	2,00E+06	4,02E+05	20%
8,045	2-tridecanona	C ₁₃ H ₂₆ O	198,198	263,8±3,0	2,79E+05	6,09E+04	22%
8,404	Ácido Dodecanóico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200,178	296,1±3,0	1,05E+05	5,52E+04	53%
9,257	2-pentadecanona	C ₁₅ H ₃₀ O	226,230	293,3±3,0	5,97E+04	1,92E+04	32%

Fonte: autor.

APÊNDICE N – RESULTADOS DE ÁREA RELATIVA PARA AS 13 MARCAS DE LEITE ESTUDADAS.

Tempo Ret. (min.)	Classe Química	Analito	LEITE UHT										FRESCO		
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
0,667	Cetona	2-propanona	25%	23%	15%	22%	14%	7%	8%	14%	72%	24%	100%	20%	46%
0,994	Cetona	3-metil-2-pentanona	86%	52%	14%	14%	15%	11%	12%	16%	65%	53%	71%	100%	86%
1,549	Cetona	2-pentanona	46%	39%	23%	31%	25%	18%	17%	31%	88%	21%	100%	0%	2%
3,397	Cetona	2-heptanona	62%	50%	31%	38%	35%	35%	30%	57%	100%	37%	99%	5%	1%
1,638	Aldeído	Pentanal	100%	43%	3%	95%	13%	15%	13%	28%	9%	84%	20%	3%	6%
2,563	Aldeído	Hexanal	100%	25%	42%	21%	39%	37%	36%	39%	79%	54%	30%	10%	21%
4,636	Álcool	2-etilhexanol	60%	63%	44%	51%	40%	27%	35%	17%	82%	47%	100%	47%	55%
5,275	Aldeído	Nonanal	50%	50%	21%	19%	18%	14%	25%	13%	100%	29%	21%	19%	23%
6,018	Hidrocarboneto	Dodecano	87%	89%	22%	57%	4%	5%	7%	25%	16%	36%	100%	5%	3%
5,154	Cetona	2-nonanona	60%	44%	22%	33%	34%	29%	26%	40%	96%	31%	100%	2%	3%
6,688	Cetona	2-undecanona	68%	51%	26%	32%	37%	29%	28%	38%	95%	30%	100%	3%	2%
8,045	Cetona	2-tridecanona	73%	66%	38%	37%	42%	35%	33%	41%	94%	34%	100%	4%	3%
9,257	Cetona	2-pentadecanona	77%	100%	52%	38%	42%	36%	32%	35%	84%	31%	89%	5%	6%
1,2	Ácido Carboxílico	Ácido Acético	23%	100%	66%	22%	15%	32%	15%	98%	21%	17%	29%	16%	13%
2,429	Ácido Carboxílico	Ácido Butanóico	40%	63%	56%	50%	44%	27%	31%	13%	60%	34%	100%	31%	24%
4,15	Ácido Carboxílico	Ácido Hexanóico	44%	55%	50%	50%	37%	23%	30%	10%	66%	34%	100%	30%	26%
4,982	Ácido Carboxílico	Ácido Heptanóico	79%	100%	62%	62%	34%	22%	34%	23%	69%	32%	76%	62%	31%
5,776	Ácido Carboxílico	Ácido Octanóico	52%	58%	54%	55%	47%	34%	40%	13%	72%	41%	100%	50%	35%
6,457	Ácido Carboxílico	Ácido Nonanóico	76%	100%	69%	63%	44%	37%	34%	30%	60%	32%	63%	73%	31%
7,155	Ácido Carboxílico	Ácido Decanóico	60%	67%	60%	61%	60%	47%	50%	16%	79%	44%	100%	71%	43%
8,404	Ácido Carboxílico	Ácido Dodecanóico	57%	94%	87%	64%	49%	35%	37%	18%	42%	16%	100%	93%	29%
4,682	Hidrocarboneto	Limoneno	7%	3%	3%	5%	7%	10%	3%	1%	2%	1%	8%	100%	37%
2,451	Hidrocarboneto	2-etilhexeno	100%	51%	2%	60%	3%	2%	8%	0%	4%	26%	5%	0%	0%
3,518	Aldeído	Heptanal	44%	21%	6%	16%	26%	24%	25%	33%	100%	34%	26%	10%	15%
4,079	Aldeído	Benzaldeído	83%	54%	9%	8%	10%	12%	15%	26%	27%	100%	23%	0%	0%
3,837	Hidrocarboneto	Alfa-pineno	6%	3%	24%	10%	31%	14%	14%	2%	35%	13%	100%	46%	42%
4,636	Aromático	para-Cimeno	3%	2%	5%	3%	5%	6%	3%	0%	6%	1%	13%	100%	35%