

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

ISOLAMENTO E CROMATOGRAFIA GASOSA DOS VOLÁTEIS
DE GRAVIOLA E MAMÃO

Maria Regina Bueno Franco
QUÍMICA

ORIENTADORA
Dra. DÉLIA RODRIGUEZ AMAYA

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Campinas - S.P. - 1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico a meus pais, Lourdes e Paulo.

AGRADECIMENTOS

À Dra Délia Rodriguez Amaya, pela paciência, amizade e a orientação cuidadosa.

Ao Dr. Frederick C. Strong III, pela obtenção nos E.U. do polímero Porapak Q e de peças para o cromatógrafo gasoso.

À Dra Maria Amélia Chaib pelo interesse e colaboração na parte de análise sensorial.

À amiga Magnólia Costa Lima, pela amizade e remessa de frutas de Recife.

À Maria do Rosário Longo Mortatti e Lúcia Valente Soares, pela correção do português e valiosas sugestões na redação do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas, por concessão de bolsa de estudos à autora.

À equipe de "sniffing", pelo interesse e disponibilidade.

À todos os meus amigos, pelo apoio e constante incentivo e,

Em especial ao Dr. Leopold Hartman, pela confiança, amizade e críticas.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iv
SUMMARY.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. DEFINIÇÃO DE TERMOS.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1. Isolamento dos Voláteis.....	7
3.2. Cromatografia Gasosa.....	42
3.3. Identificação dos Voláteis.....	43
3.4. Avaliação Sensorial.....	46
3.5. Estudos da Composição Volátil em Mamão e Cupuaçu.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1. Seleção da Matéria Prima.....	51
4.2. Amostragem e Preparo da Amostra.....	52
4.3. Isolamento dos Voláteis.....	52
4.3.1. "Direct headspace analysis".....	52
4.3.2. Análise direta do gás da cavidade.....	53
4.3.3. Captura por sucção em Porapak Q.....	53
4.4. Cromatografia Gasosa.....	56
4.5. Condições Ótimas de Captura dos Voláteis de Graviola em Porapak Q.....	57
4.6. Avaliação da Reprodutibilidade do Método de Isolamento.....	58

	Página
4.7. Aplicabilidade do Método.....	59
4.7.1. Comparação do perfil dos voláteis em sucos frescos e processados de <u>gra</u> viola.....	59
4.7.2. Comparação do perfil dos voláteis de mamão em vários estados de amadureci mento.....	59
4.8. Avaliação Sensorial.....	60
4.8.1. Teste de preferência.....	60
4.8.2. "Sniffing".....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1. Estudo dos Voláteis de Graviola.....	63
5.1.1. Otimização do método de isolamento dos voláteis.....	63
5.1.2. Reprodutibilidade do método de <u>iso</u> lamento.....	75
5.1.3. Retenção da composição original.....	78
5.1.4. Comparação de sucos frescos e <u>pro</u> cessados.....	81
5.1.5. Teste de preferência.....	85
5.2. Estudo dos Voláteis de Mamão.....	87
5.2.1. Comparação da composição dos voláteis em três estados de amadurecimento.....	87
5.2.2. Resultados do "sniffing".....	95
5.3. Limitações do Método de Aprisionamento em Porapak Q.....	97
5.4. Análise do Gás da Cavidade de Mamão e Cupuaçu..	98
6. CONCLUSÕES.....	101
BIBLIOGRAFIA.....	103

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Reprodutibilidade do método de captura por sucção em Porapak Q.....	76
2. Comparação da reprodutibilidade.....	77
3. Quantidades relativas dos voláteis obtidas por "direct headspace" e por captura por sucção em Porapak Q.....	79
4. Comparação entre a composição dos voláteis do suco fresco e dos sucos processados.....	83
5. Componentes voláteis de mamão em três estádios de amadurecimento.....	88
6. Avaliação sensorial dos picos individuais por "sniffing".....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Sistema de aprisionamento em Porapak Q para beb <u>i</u> das alcoólicas de Jennings et al.....	15
2. Arranjo de armadilhas para a coleta de volá <u>t</u> eis do "headspace" segundo Murray.....	22
3. Sistema para captura em polímero poroso dos volá <u>t</u> eis do "headspace" segundo Singleton e Pattee.....	33
4. Cromatograma dos volá <u>t</u> eis produzidos mediante li <u>p</u> oxigenase em homogenizados de soja e de am <u>e</u> doim.....	35
5. Sistema de coleta dos volá <u>t</u> eis de vinho por des <u>c</u> locamento segundo Noble et al.....	40
6. Sistema de aprisionamento em Porapak Q por suc <u>ç</u> ção.....	54
7. Cromatogramas ilustrando a relação entre o com <u>p</u> primento da armadilha e o volume do solvente.....	64, 65
8. Cromatogramas ilustrando o efeito do tempo de co <u>l</u> leta.....	67
9. Cromatogramas ilustrando o efeito de equilibra <u>ç</u> ção da amostra.....	69
10. Cromatogramas ilustrando o efeito da direção de eluição.....	70

11. Cromatogramas ilustrando o efeito de adição de sal em amostras frescas.....	74
12. Cromatogramas típicos dos voláteis de suco de graviola.....	82
13. Cromatogramas dos voláteis de mamão no estado verde.....	89
14. Cromatogramas dos voláteis de mamão no estado intermediário.....	90
15. Cromatogramas dos voláteis de mamão no estado maduro (com bom cheiro).....	91
16. Cromatograma dos voláteis de mamão, concentrados por destilação à vácuo-extração com éter, obtido por Flath e Forrey.....	94

RESUMO

A técnica de "headspace sampling" de Singleton e Pattee (47) foi modificada e usada para isolar os componentes voláteis de suco de graviola. A captura em Porapak Q foi feita com o uso de um vácuo baixo e constante e de condições especificamente determinadas para os voláteis de graviola. A equilibração da amostra não foi necessária e os voláteis capturados puderam ser desorvidos por desorção normal ou reversa. A adição de NaCl preveniu as transformações enzimáticas dos constituintes voláteis durante a preparação da amostra de frutas frescas. Os cromatogramas obtidos com o uso de coluna capilar de alta resolução e de programação de temperatura demonstraram uma reprodutibilidade maior do que qualquer outro método citado na literatura até agora. Além disso, as quantidades relativas originais dos voláteis foram mantidas.

Diferenças pronunciadas, qualitativa e quantitativamente, foram observadas entre os cromatogramas do suco fresco e dos sucos comerciais. A maioria dos picos diminuiu marcadamente e novos voláteis foram formados no suco processado. Estas mudanças foram devidas ao processo de pasteurização e não às modificações enzimáticas. Das duas marcas comerciais avaliadas, a marca A não mostrou, praticamente, diferenças entre as garrafas analisadas, mas os cromatogramas da marca B foram mais semelhantes aos cromatogramas do suco fresco. Portanto, o controle das etapas de processamento foi melhor para a marca A, porém a marca B foi

sujeita a um tratamento térmico menos rigoroso.

O método também foi usado para estudar os voláteis de mamão usando o tempo ótimo de captura especificamente determinado para esta fruta. Os cromatogramas demonstraram considerável variação qualitativa e quantitativa dos componentes voláteis mesmo entre frutas de um mesmo estado de amadurecimento. O número e, em geral, as quantidades dos voláteis aumentaram com o amadurecimento. A avaliação preliminar da contribuição sensorial dos constituintes voláteis por "sniffing" mostrou a importância de alguns voláteis.

SUMMARY

The headspace sampling technique of Singleton and Pattee (47), in which the volatiles are swept to a Porapak Q trap by suction rather than by a sweeping gas, was modified and used to isolate the volatile components of soursop juice. The trapping was accomplished using fixed, low vacuum and operating conditions determined specifically for soursop volatiles. Equilibration of the sample was not necessary and the trapped volatiles could be desorbed either by backflushing or throughflushing. The addition of NaCl effectively prevented enzymatic transformation of the volatile constituents during sample preparation from fresh fruits. The chromatograms of the volatiles, obtained with the use of high resolution capillary column and temperature programming, demonstrated a reproducibility higher than that of any other method reported in the literature up to the present time. In addition, the original relative amounts of the volatiles were maintained.

Pronounced qualitative and quantitative differences were observed in the chromatograms of fresh and two commercial brands of pasteurized juice. The majority of peaks decreased markedly and new volatiles were formed in the processed juice. These changes were due to the pasteurization process itself; enzymatic modification was not involved. Of the two brands evaluated, brand A showed practically no difference between different bottles but brand B approximated the fresh fruit better. This indicated that, although the control of the processing operation was better for brand A,

brand B was subjected to a milder heat treatment.

The method had also been used to study the volatiles of ripening papaya fruit, using the trapping time found to be optimum for this sample. The chromatograms demonstrated considerable qualitative and quantitative variation of the volatile components even among fruits at the same stage of maturity. The number and, in general, the amounts of the volatiles increased with ripening. Preliminary evaluation of the sensory contribution of the volatile constituents pointed to the importance of some volatiles.

1. INTRODUÇÃO

Aroma e gosto são fatores determinantes na seleção de frutas ou qualquer outro alimento. Esses dois fatores estão inter-relacionados e sua sensação conjunta é denominada sabor. O sabor básico é devido aos componentes não voláteis, como açúcares e ácidos orgânicos. O sabor característico, porém, tem sido diretamente atribuído a um vasto número de compostos voláteis, presentes em quantidades extremamente diminutas.

Estudos sobre componentes voláteis têm adquirido grande importância prática, devido à sua fácil perda e/ou modificação durante o processamento, o que resulta em produtos processados que não apresentam mais o sabor típico da fruta. A composição de voláteis em frutas de clima temperado tem sido objeto de muita pesquisa. Com poucas exceções, o delicado e exótico sabor de frutas tropicais tem recebido somente atenção esporádica. Considerando que o comércio de frutas e sucos processados no Brasil está em franca expansão, a necessidade desse tipo de estudo é urgente.

A pesquisa do sabor é muito complexa, e tal complexidade pode ser entendida pelas seguintes observações:

- 1º) O sabor usualmente consiste de um grande número de constituintes orgânicos que variam marcadamente em sua natureza química, propriedades e concentrações relativas;

- 2º) Os constituintes do sabor estão presentes em quantidades extremamente pequenas (ppm, ppb ou ppt);
- 3º) Os constituintes do sabor tendem a ser lábeis e qualquer aumento na temperatura durante a separação e concentração pode causar, por exemplo, rearranjos, ciclização, desidratação.
- 4º) Nenhum constituinte individual é totalmente responsável por um sabor característico de um alimento específico. Comumente o sabor é uma resposta integrada a uma mistura de compostos. Entretanto, em certos alimentos, um ou dois compostos de caráter impactante foram reconhecidos e identificados.

Basicamente, a análise do sabor compreende as seguintes etapas:

1º) isolamento e concentração dos constituintes do sabor; 2º) separação por cromatografia gasosa e identificação dos constituintes por espectrometria de massa ou infra-vermelho; 3º) avaliação da importância sensorial dos constituintes.

O desenvolvimento de técnicas altamente sofisticadas para a separação (cromatografia gasosa) de misturas complexas de voláteis e para a identificação desses componentes (Espectrometria de massa - Infra-vermelho) permitiu um grande avanço na pesquisa do sabor. Os procedimentos dessas etapas já foram, de um modo geral, estabelecidos. A etapa que causa ainda muita polêmica é a preparação da amostra. As técnicas existentes acarretam mudanças qualitativas e quantitativas, levando a uma composição

completamente diferente daquela anterior ao isolamento. Portanto, os cromatogramas encontrados na literatura dificilmente refletem a composição original da amostra.

A amostragem por "headspace" tem sido largamente usada em pesquisa do sabor, pois os voláteis na fase de vapor acima do produto representam mais o aroma do que a própria composição volátil no alimento. Entretanto, devido às concentrações limitantes da maioria dos voláteis do "headspace" e a presença de grande quantidade de vapor de água, uma etapa de pré-concentração é geralmente necessária. Infelizmente até agora não foi ainda estabelecido um método de pré-concentração que fosse reproduzível e mantivesse a composição volátil sobre a amostra, apesar de que as mudanças desse tipo de isolamento são muito menores do que ocorrem no isolamento total dos voláteis da amostra.

Os objetivos deste trabalho são:

- 1º) Procurar um método para isolamento dos voláteis do "headspace" que reúna as seguintes propriedades: a) não altere a composição original da amostra, b) reproduzível, c) economicamente viável nas condições de laboratório do Brasil e d) tenha ampla aplicabilidade.
- 2º) Testar a aplicabilidade do método na: a) avaliação do efeito do processamento na composição volátil em suco de graviola e b) verificação de mudanças na composição volátil durante o amadurecimento em mamão.

2. DEFINIÇÃO DE TÊRMOS

Devido à natureza pioneira deste trabalho no Brasil, a definição de alguns termos é necessária. Depois do termo em português, o termo em inglês é colocado em parênteses. O termo em inglês foi conservado no caso de não se ter encontrado uma tradução adequada.

"Headspace volatiles" - mistura de vapores acima e em equilíbrio com os voláteis da amostra em um sistema fechado.

"Direct headspace sampling" - um método de amostragem em que cinco ml da fase de vapor acima da amostra em um sistema fechado são retirados com uma seringa a gás e imediatamente injetados no cromatógrafo.

Aprisionamento, captura ou captação em polímero poroso - (porous polymer trapping) isolamento dos voláteis por adsorção em uma armadilha de polímero poroso.

Armadilha - (trap) uma coluna de vidro, de aproximadamente 15 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro, empacotada com um adsorvente, ou resfriada por gelo seco ou nitrogênio líquido.

Gás transportador (carrier gas) e gás de arraste (flushing, sweeping ou entrainment gas) - o "carrier gas" foi traduzido nos livros do Ciola (9) e do Ewing (15) como gás de arraste e por Otto Alcides (42) como gás transportador. Já que ele funciona só

para transportar a amostra através da coluna do cromatógrafo a gás, neste trabalho preferimos a tradução de gás transportador. Portanto, podemos usar gás de arraste como tradução de "flushing gas" porque neste caso o gás serve realmente para arrastar os voláteis à armadilha.

Fase de desenvolvimento - (development step) uma fase em que o gás de arraste continua a passar pelo polímero depois da captura dos voláteis afim de permitir a eliminação de água, álcool ou outro componente em concentração suficientemente alta para obliterar uma porção do cromatograma.

Desorção normal - (throughflushing) a eluição é feita na mesma direção em que os voláteis foram arrastados à armadilha.

Desorção reversa - (backflushing) a eluição é feita na direção contrária àquela que os voláteis foram arrastados à armadilha, sendo que a armadilha é invertida após a captura dos voláteis.

Condicionamento do polímero - (conditioning of the polymer) passagem de um gás inerte a uma temperatura próxima, porém inferior à temperatura de estabilidade do polímero, afim de eliminar quaisquer impurezas adsorvidas no polímero.

Equilibração da amostra - (equilibration of the sample) etapa em que a amostra deixada em um sistema fechado por algum tempo para que os voláteis do "headspace" e da amostra atinjam o equilíbrio.

Resolução dos picos - (resolution of peaks) refere-se ao grau de alargamento da banda durante o transporte de um componente através da coluna cromatográfica (indicado por h ou H).

Separação dos picos - (separation of peaks) refere-se ao grau que dois componentes são separados pela coluna. (Indicado por α)

Componente caráter impacto - (character impact compound) componente que exibe o aroma característico do produto.

Componente contribuintório para o sabor - (contributory flavor compounds) componente que não exibe o aroma característico do produto, porém contribui ao aroma, como por exemplo sugerindo notas florais.

"Gas make up" - uma outra linha do gás (N_2) ligada após a coluna capilar e antes do detector para suplementar a vazão do gás para 30 ml/min., fluxo este onde ocorre a máxima sensibilidade do detector. É usada juntamente com coluna capilar porque neste tipo de coluna é necessário um fluxo muito baixo do gás transportador.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Isolamento dos Voláteis

Existem duas maneiras de abordar o problema de isolamento de voláteis para cromatografia gasosa: análise total e "headspace analysis". Análise total compreende todos os componentes voláteis da amostra, enquanto "headspace analysis" compreende os componentes de menor ponto de ebulição, ou seja, os componentes na fase de vapor acima do produto (56).

Weurman (56) salientou três aspectos básicos na pesquisa do sabor, e que um preciso conhecimento de cada um desses aspectos é essencial para uma melhor compreensão do fenômeno do sabor em alimentos:

- 1º) A composição qualitativa e quantitativa dos voláteis no alimento, a qual requer a aplicação da análise total;
- 2º) A composição dos vapores dos componentes voláteis sobre e em equilíbrio com o alimento, tal como percebemos pelo nosso senso do olfato e a qual requer "headspace analysis";
- 3º) O estado físico e a distribuição dos componentes voláteis no alimento. Esse último aspecto pode ser considerado como a causa efetiva do sabor do nosso produto e relaciona a composição do "headspace" à composição total dos voláteis no produto.

Em análise total, destilação é a etapa mais usualmente empregada para isolar os voláteis dos materiais não voláteis, seguida por uma etapa de concentração, envolvendo extração ou adsorção. Na destilação, seja à pressão atmosférica ou reduzida, seja de um único prato ou de vários utilizando refluxo, o material sempre estará sujeito a um tratamento rigoroso por um longo período de tempo, quase sempre com formação de artefatos (26).

Extração é a etapa de concentração mais empregada pelos pesquisadores. O solvente é selecionado por sua eficiência de extração, inertidade e ponto de ebulição. Mudanças composicionais ocorrem nessa etapa também devido à solubilidade seletiva dos voláteis no solvente, introdução de impurezas e ainda perda de certos componentes na posterior remoção do solvente.

Nickerson e Likens (39) desenvolveram uma unidade de destilação e extração simultâneas, que tem sido usada por um grande número de pesquisadores (6, 17, 66). A vantagem é que apenas uma pequena quantidade do solvente orgânico é usada, minimizando a possibilidade de introdução de artefatos dessa fonte, além da redução do tempo total do processo.

Adsorção, procedimento de concentração não tanto usado como o anterior, é geralmente feito sobre carvão ativo (43, 50). Carvão ativo tem a grande vantagem de não ser desativado por água e apresenta grande capacidade de adsorção de compostos orgânicos. O procedimento é bastante simples e consiste de um tubo de vidro cheio com o adsorvente, através do qual o destilado aquo

so é forçado a passar. O método é em certa extensão seletivo (56) com grande capacidade de produzir artefatos. Por exemplo, compostos que são prontamente oxidados podem oxidar-se durante a adsorção. Deve-se considerar ainda que a desorção não é realizada facilmente, podendo ocorrer eluição preferencial ou parcial.

Quanto à análise direta dos vapores do "headspace", Jennings (26) afirma que esse tipo de análise possui uma atraente e desejável simplicidade. Apresenta uma distinta vantagem em relação à análise total, pois evita etapas de preparação da amostra, que invariavelmente engendram mudanças composicionais dos voláteis. Jennings salienta ainda que, em muitos casos, composições de "headspace" são muito mais significativas do que análise total dos voláteis resultantes de destilação e/ou extração.

Um número de pesquisadores utilizaram "direct headspace analysis" em seus esforços de obterem cromatogramas mais representativos do material inicial. Essa técnica tem se revelado especialmente útil em seguir mudanças qualitativas e quantitativas que ocorrem durante o amadurecimento de frutas (35, 36) e produções enzimáticas de voláteis (31, 48) pois não destrói a amostra e permite análises sequenciais.

"Direct headspace analysis" apresenta a desvantagem de que injeções diretas de uma amostra de vapor muito diluída produzem picos apenas para esses componentes que possuem pressão de vapor relativamente alta e estão presentes em quantidade suficiente

para ativar o detector. Embora um maior tamanho de amostra aumentasse a quantidade do material a ser detectado, uma injeção maior não é consistente com alta resolução. Consequentemente, uma etapa de pré-concentração dos vapores do "headspace" se torna necessária, a fim de enriquecer os vapores de componentes menores em concentração.

Foram tentados vários métodos para concentrar os voláteis no "headspace", tais como condensação em armadilhas resfriadas (16, 23, 37) e enriquecimento em carvão ativo (32, 35, 58). No uso de armadilhas resfriadas, a manipulação de grande quantidade de vapores do "headspace" leva sempre à condensação de grande quantidade de água nas armadilhas. A água não contribui para o aroma e pode ser considerada como o principal contaminante que deve ser eliminado. Além disso, a presença de água na amostra diminui o tempo de vida útil das colunas cromatográficas e interfere na posterior identificação dos voláteis por espectrometria de massa e infra-vermelho.

Alguns pesquisadores tentaram a retirada da água através de uma pré-coluna de dissecante (21, 44). Essas tentativas, entretanto, mostraram adsorção parcial ou completa no dissecante de constituintes importantes para o aroma.

Por algum tempo, a concentração dos voláteis do "headspace" foi feita através de carvão ativo. Entretanto, devido aos problemas que surgiram com esse adsorvente (seletividade da adsorção, formação de artefatos e desorção incompleta) polímeros porosos

foram introduzidos para enriquecimento dos vapores do "headspace" no início de 1970.

Em 1971, Dravinieks e O'Donnell (11), acrescentando que a análise quantitativa dos voláteis do "headspace" fornece informações mais relevantes para o aroma, sugeriram que os problemas do vapor de água e da baixa concentração dos voláteis poderiam ser solucionados pela adsorção dos voláteis em um polímero de estireno-divinil-benzeno em temperatura ambiente. Cinco gramas do polímero seriam suficientes para isolar os compostos orgânicos de 10 l de ar.

Nos próximos anos, numerosas e diversas técnicas empregando "porous polymer headspace collection" foram relatadas. Quatro componentes geralmente fazem parte do sistema: 1) um gás de arraste altamente purificado; 2) um recipiente para a amostra; 3) uma armadilha do polímero poroso e; 4) um meio de desorção

Ainda em 1971, Schultz *et al.* (44) fizeram a análise dos voláteis do "headspace" de laranja, utilizando uma pré-coluna empacotada com Chromosorb 101 que rejeita água, mas adsorve constituintes orgânicos. Nitrogênio, (16 ml/min.) passava pelo frasco com a amostra agitada magneticamente, arrastando os voláteis pela pré-coluna. Depois de um tempo determinado de coleta, (~ 12h) o frasco com a amostra era retirado do sistema e a pré-coluna acoplada diretamente a um tubo de nitrogênio. A passagem de nitrogênio foi continuada para remover a água remanescente na pré-coluna. Os voláteis foram desorvidos termicamente da pré-

coluna através de um bloco aquecedor e transferidos pela pas
sagem de hélio purificado a uma armadilha resfriada com nitro
gênio líquido. A armadilha foi conectada diretamente à linha de
hélio e rapidamente aquecida por um banho de glicerol a 140°C,
assim arrastando os voláteis ao cromatógrafo. Vinte e nove cons
tituintes voláteis foram identificados por cromatografia gas
sa - espectrometria de massa, seis dos quais não tinham sido
ainda detectados em laranja.

Schultz *et al.* avaliaram três materiais de empacotamento: Pora
pak Q, Chromosorb 101 e Chromosorb 102, usando três compostos
representativos dos voláteis de laranja. Escolheram Chromosorb
101 baseado no tempo de retenção dos componentes de menor movi
mento. Constataram, porém, o sangramento de vários compostos du
rante a eluição, provenientes do próprio Chromosorb 101, embo
ra o polímero tivesse sido previamente condicionado. Entretanto,
o fato do sangramento ser constante permitiu que os picos fos
sem subtraídos dos cromatogramas do vapor de laranja.

Os cromatogramas obtidos pela técnica descrita acima e por
"direct headspace analysis" mostravam concentrações relativas
marcantemente diferentes, devido a vários fatores tais como ad
sorção na coluna cromatográfica, incompleta eluição dos componen
tes adsorvidos na pré-coluna, e ainda a variabilidade inerente
aos sucos de laranja, pois os voláteis não foram retirados da
mesma amostra. Sugeriram um maior tempo de condicionamento da
pré-coluna e, para evitar a possibilidade de alteração química,
já sugeriram a remoção dos constituintes voláteis adsorvidos

com um fluxo reverso do gás e o uso de uma menor temperatura de desorção do que a empregada em seu trabalho.

Em 1972, Tressl e Jennings (53) empregaram uma armadilha contendo Porapak Q para estudar a emissão volátil durante o amadurecimento de bananas. Estas ainda verdes eram colocadas em uma câmara de vidro onde ar purificado passava sobre a amostra com um fluxo de $300 \text{ cm}^3/\text{min}$. O gás efluentes e os voláteis passavam através de recipientes com padrões internos e depois se dirigiam à armadilha de Porapak. Posteriormente, o gás foi mudado para nitrogênio purificado pois foi percebida severa degradação, tanto na resina como nos voláteis, quando usavam ar como gás efluentes. Era necessária também uma fase de desenvolvimento para remover água. Os voláteis foram desorvidos com um fluxo reverso de nitrogênio, a 100°C , a um capilar de vidro resfriado com gelo seco.

A técnica de adsorção em polímeros porosos começa a ganhar interesse e logo tem várias aplicações que vão desde análise do "headspace" de bebidas alcoólicas, (3, 29, 60) análise de sistemas biológicos (49, 67) até análise de componentes traços em amostras de água (2, 20, 33).

Foi em bebidas alcoólicas onde a técnica encontrou sua maior aplicação pois os polímeros porosos, principalmente Porapak Q, possuem baixa retenção de etanol, o principal componente das bebidas que pode obliterar uma grande porção do cromatograma. A fase de desenvolvimento permite a eliminação quase total de

água e etanol.

Jennings *et al.* (29) ainda em 1972 introduziram um sistema inteiramente feito com vidro para isolamento dos voláteis de bebidas alcoólicas, consistindo em um balão, onde a amostra era colocada, conectado a uma coluna empacotada com Porapak Q (Figura 1). Nitrogênio era borbuhlado através da amostra, passando em seguida na armadilha. Depois de um pré-determinado período, o balão com a amostra era removido do sistema e substituído por um tubo vazio para a fase de desenvolvimento. O tempo de desenvolvimento foi aumentado até o ponto onde etanol cessava de ser um problema cromatográfico. Finalmente, a armadilha era reversa, aquecida e os voláteis do aroma recuperados em um tubo capilar de vidro mergulhado em gelo seco. Depois da coleta, o capilar era selado em chama e centrifugado para dirigir a essência obtida em uma das pontas para posterior remoção com a seringa.

Os cromatogramas obtidos de vinhos e bebidas destiladas mostravam que o método podia ser aplicado em uma variedade de bebidas alcoólicas tendo aroma complexo. O método era aparentemente sensível o suficiente para determinar diferenças entre amostras, embora os cromatogramas não fossem representativos da composição original do "headspace".

Em 1974, Jennings *et al.* (30) aplicaram a técnica descrita acima para estudar os voláteis da cerveja, controlando rigorosamente a temperatura da amostra, temperatura da armadilha, velocidade do gás efluente, tempo de coleta e de recuperação. O procedi

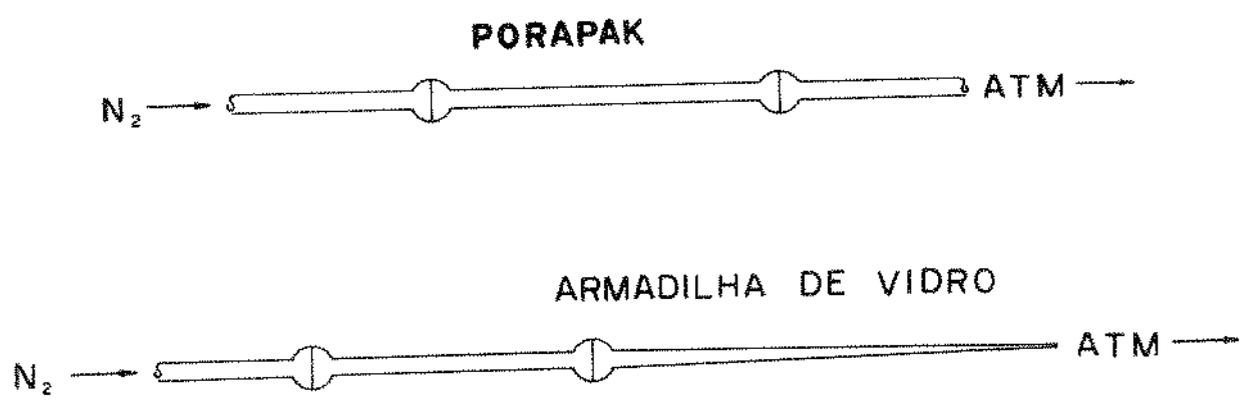
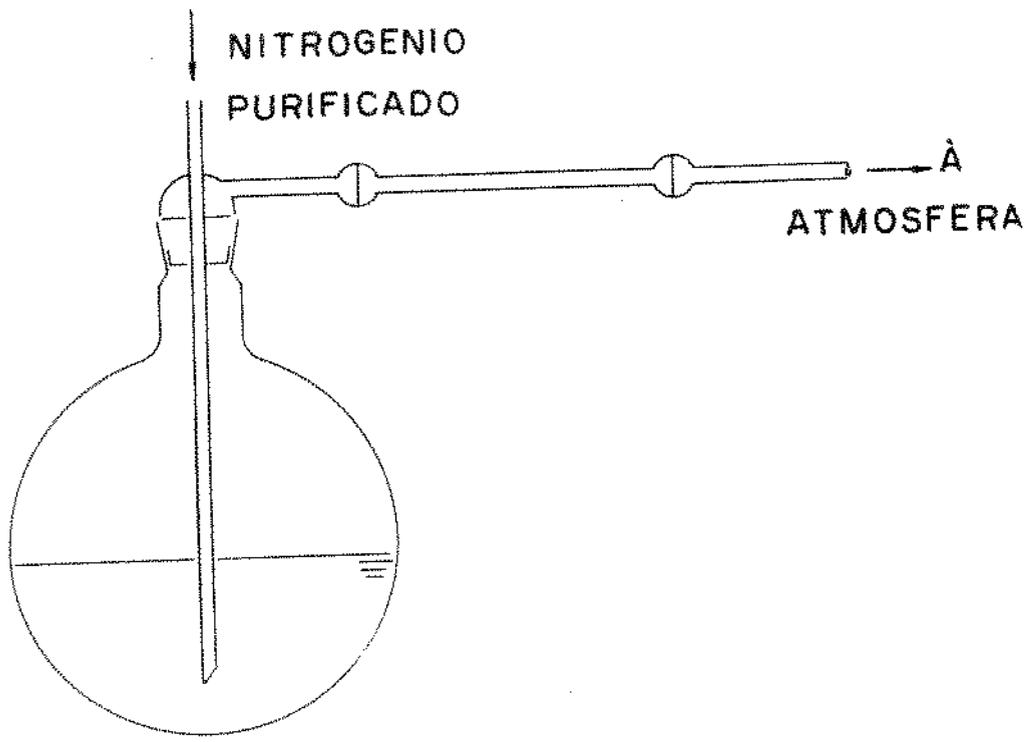


Fig. 1. Sistema de aprisionamento em Porapak Q para bebidas alcoólicas de Jennings et al. (29).

mento permitiu que isolasse 100 voláteis do "headspace" de cer
veja ao invés dos 8 ou 10 normalmente obtidos por "direct head
space analysis". Segundo os autores, foi obtida também uma exce
lente reprodutibilidade, com coeficiente de variabilidade em
torno de $\pm 10\%$, embora não tenha sido mostrado os cálculos.

Bertuccioli e Montedoro (3) criticaram a técnica de aprisiona
mento em polímero poroso com a passagem de nitrogênio por duas
razões. Primeiro, as concentrações dos voláteis no "headspace"
dependem não somente de suas pressões de vapor e concentrações
na amostra (lei de Henry) mas também dos coeficientes de ativi
dade que, por sua vez, são afetados pelo conteúdo de água, lipí
deos, carboidratos, proteínas, polifenóis, sais e outras maté
rias no alimento. A lei de Henry perde sua validade na rápida
retirada dos voláteis, pois o equilíbrio entre os voláteis na
amostra e os voláteis na fase de vapor acima da amostra é inter
rompido. Segundo, essa técnica geralmente requer a desorção e
transferência dos voláteis da armadilha ao cromatógrafo causan
do perdas ou mudanças de alguns componentes. Eles se propuseram
a desenvolver um método analítico que permitisse, de um lado, a
concentração de um grande volume do vapor do "headspace" de be
vidas sem modificar sua composição original, e de outro lado,
eliminar as inerentes manipulações na transferência da amostra
ao cromatógrafo gasoso.

Sua técnica de captura consiste em uma seringa especialmente de
senvolvida, na qual a amostra era colocada na parte superior do
pistão e a armadilha de Porapak conectada à própria seringa. De

pois de um período de tempo em que o vapor de "headspace" atingia o equilíbrio, o vapor era empurrado através da armadilha de Porapak Q pelo lento movimento do pistão. A armadilha era ligada diretamente ao bloco de injeção e à coluna cromatográfica. Experiências foram conduzidas para determinar as dimensões ótimas da seringa, quantidade da amostra, tempo e temperatura de equilíbrio dos compostos voláteis individuais e dimensão da armadilha. Para isso, foi usado um sistema-modelo reproduzindo as condições do vinho, isto é, os componentes voláteis em uma matriz contendo polifenóis, açúcares, proteínas, ácidos orgânicos e inorgânicos e pectina. O método desenvolvido foi aplicado a 2 vinhos brancos e os cromatogramas obtidos mostraram a presença de apenas 21 voláteis, mas atestavam a sensibilidade do método para diferenciar vinhos possuindo características qualitativas similares. A reprodutibilidade parecia excelente embora fosse testada em apenas 5 componentes.

Uma modificação simples mas inteligente de "direct headspace analysis" foi introduzida por Yabumoto *et al.* em 1974 (64). Essa modificação consiste na retirada dos voláteis da cavidade da fruta através de um tubo de vidro. O método é simples, evita as mudanças enzimáticas que ocorrem após descascamento e cortagem da fruta, e também permite a retirada sequencial de amostras de uma mesma fruta. É portanto, bem apropriado aos estudos sobre maturação de frutas.

O método foi aplicado para seguir mudanças nos constituintes voláteis de melão (*Cucumis melo*) durante amadurecimento. Foi ob

servado que os voláteis seguem cinco casos: 1) um aumento acelerado em concentração (isobutirato de metila, propionato de etila; 2) aumento rápido por poucos dias e nivelamento (plateau) (acetatos de butila e isobutila); 3) aumento com razão constante (acetato de propila, n-hexanol); 4) concentração constante; e 5) flutuação ao acaso.

Em 1975, Gill e Noble (21) desenvolveram uma técnica rápida e reproduzível, baseada no método de Morgan e Day (37). A amostra era colocada em um erlenmeyer e nitrogênio com um fluxo de 50 ml/min. era usado para carregar os voláteis a uma seção resfriada da coluna cromatográfica (imersa em nitrogênio líquido) empacotada com Porapak Q. Entre a amostra e a pré-coluna era inserido um tubo contendo dissecante (15 g de K_2CO_3). Depois da captura, a coluna era retirada do sistema, colocada no cromatógrafo, e a separação cromatográfica iniciada. Usando esse método foram isolados, quantificados e identificados 5 voláteis em suco de tomate. A reprodutibilidade foi examinada por análise de variância em 4 repetições dos 5 compostos.

Para resolver o problema do vapor de água condensada na coluna de Porapak Q, causando severo alargamento dos picos no cromatograma, os autores optaram pelo uso de dissecante em vez do desenvolvimento normalmente usado para eliminação de água. Os autores argumentaram que desorção reversa remove os componentes mais voláteis possuindo tempo de retenção perto da água em Porapak Q. Além disso, seria necessária a eluição dos voláteis a um capilar resfriado antes da injeção. Gill e Noble, porém, res

saltaram o problema de adsorção dos componentes polares no dissecante. Mas, segundo os autores, o uso do dissecante, o resfriamento da pré-coluna em nitrogênio líquido e a inversão da pré-coluna quando inserida no cromatógrafo, permitiram a direta introdução dos voláteis no instrumento e a obtenção de picos agudos.

Ainda em 1975, Sirikulvadhana *et al.* (49) coletaram os voláteis do aroma de rosas. Estas eram colocadas no estado de botão em uma câmara de vidro. Ar umidificado com um fluxo de 150 ml/min. passava pela amostra e depois pela armadilha de Porapak Q. Nesse caso, os voláteis foram capturados por cinco dias, até que as flores se abrissem completamente. A capacidade do Porapak Q para a maioria dos compostos orgânicos nas condições do estudo era muito alta e, mesmo após cinco dias, não foi detectado nenhum aroma no gás efluente depois de passar pela armadilha.

Polímeros porosos encontraram aplicação também na análise de traços de compostos orgânicos em água. Bertsch *et al.* (2) determinaram os voláteis por cromatografia gasosa - espectrometria de massa, em água potável e em um rio que passa por uma área altamente industrializada. Um grande número de compostos clorados e bromados foram detectados em água potável enquanto que derivados de cânfora e terpeno foram identificados na água do rio. Para a coleta dos voláteis, nitrogênio puro borbulhava com um fluxo entre 40 e 80 ml/min. dentro da amostra, passava primeiro em um condensador para reter a grande maioria do vapor de água e depois às duas armadilhas que contém camadas de carvão

ativo e Tenax GC. O equilíbrio foi estabelecido entre a fase gasosa e a fase líquida a 70°C, por um aquecedor externo ao frasco com a amostra. Substâncias orgânicas com partição na fase gasosa foram então continuamente removidas da água pelo deslocamento do equilíbrio com a introdução do fluxo de gás inerte. Para a transferência dos voláteis assim coletados na coluna cromatográfica, uma ponta desta foi dobrada em forma de U para acomodar-se em um pequeno frasco de Dewar com nitrogênio líquido. A armadilha era colocada no injetor do cromatógrafo e os voláteis, desorvidos pelo calor, condensavam-se no início da coluna resfriada.

Em 1976, Butler e Burke (5) avaliaram a eficiência de vários adsorventes comercialmente disponíveis, fornecendo um método sistemático para escolher adsorventes baseado tanto na capacidade do adsorvente como na eficiência de desorção. Estudaram Tenax - GC, Chromosorb 101 e 102, Porapak P, Q, R e T. Os resultados mostraram que Porapak Q e R têm a melhor capacidade para os compostos estudados, os quais eram representantes de classes importantes. Foi percebido que adsorventes com maior área de superfície têm maior capacidade. Mas pelo fato da capacidade depender da natureza do adsorbato, nenhum deles será o melhor para todo o tipo de aplicação. O adsorvente deve ser escolhido para se adequar a um problema particular. O uso de Tenax GC parecia mais apropriado para amostras consistindo apenas em componentes de alto ponto de ebulição por causa de sua alta estabilidade térmica e volume de retenção relativamente baixo.

Em 1977, Murray (38) descreveu sistemas para a coleta dos voláteis do "headspace" de amostras sólidas e de soluções aquosas por armadilhas contendo o polímero Chromosorb 105 (Figura 2). Murray inseria duas armadilhas dentro do frasco com a amostra, o que permitia coleta perto da fonte dos voláteis, eliminando qualquer risco de contaminação ou adsorção nas linhas de conexão. A armadilha mais próxima da amostra era a principal, usualmente retendo todos os voláteis. A outra armadilha era usada para conferir o grau de adsorção pela primeira. Uma terceira armadilha, agora inserida na linha de entrada de nitrogênio no frasco, removia qualquer contaminante orgânico do gás de entrada. Seguia-se depois da captura dos voláteis a habitual fase de desenvolvimento. A fase de desorção e recuperação dos voláteis era complexa, porém engenhosa, evitando a manipulação da amostra. O injetor do cromatógrafo foi modificado para permitir a introdução direta da armadilha no cromatógrafo e a ventilação de uma parte da amostra à atmosfera, para evitar o alargamento dos picos na coluna capilar devido ao baixo fluxo do gás de arraste. Os voláteis, por meio de válvula, eram então dirigidos a uma pré-coluna resfriada com nitrogênio líquido. Os voláteis congelados eram introduzidos então na coluna capilar pela substituição do nitrogênio líquido por uma jaqueta pré-aquecida e a análise seguia como normalmente. A técnica foi aplicada para:

- 1º) Exame dos voláteis de suco de maracujá roxo e amarelo e seus híbridos comerciais;
- 2º) Isolamento e identificação de constituintes traços de vegetais;
- 3º) Identificação de componentes voláteis da secreção glandular anal de coelhos selvagens,

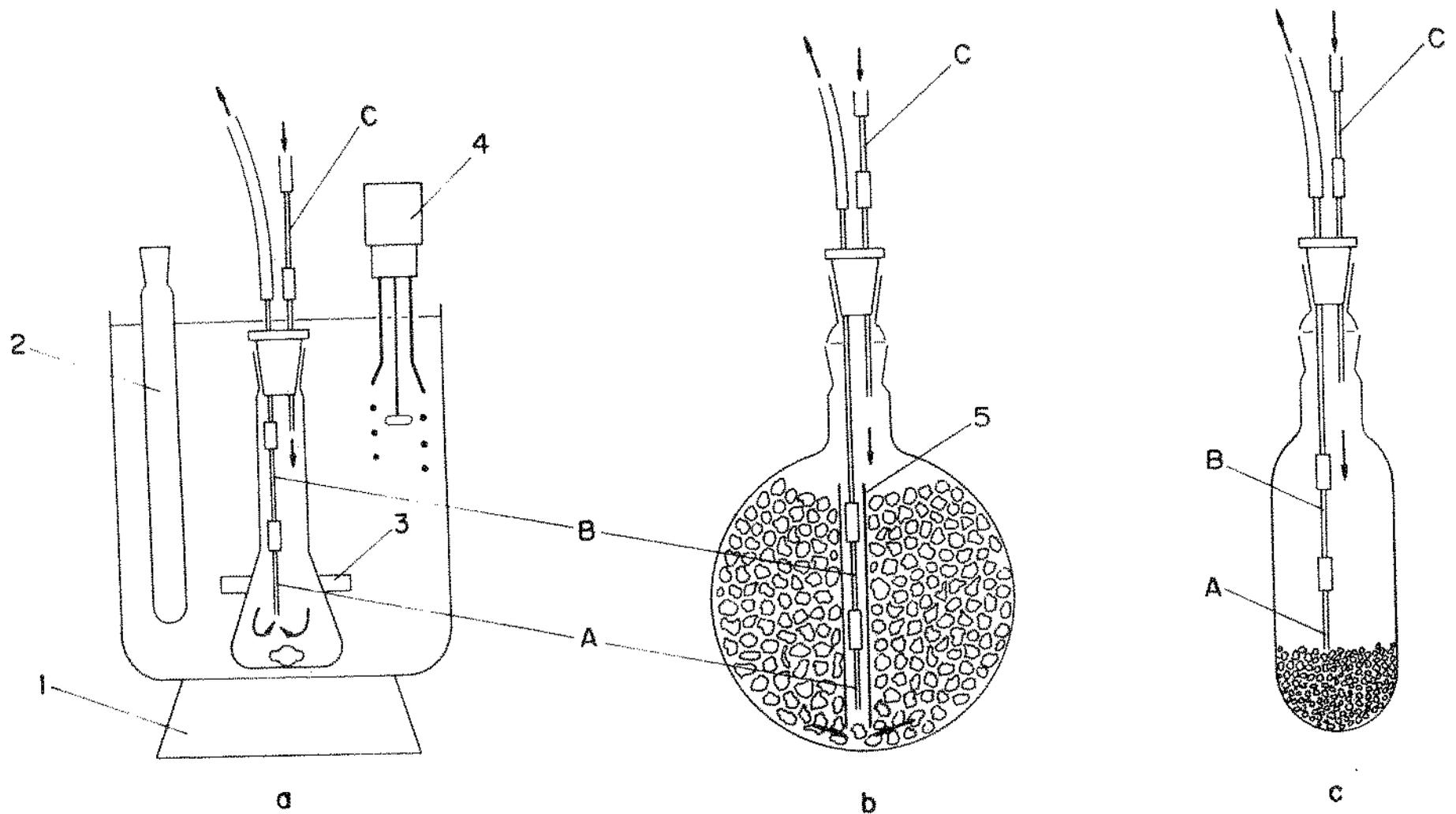


Fig. 2. Arranjo de armadilhas para a coleta dos voláteis do "headspace" segundo Murray (38), para (a) líquidos, (b) sólidos, (c) sólidos densos. 1 = agitador magnético, 2 = "purge tube", 3 = colar de chumbo, 4 = agitador-controlador da temperatura, 5 = tubo de teflon, A = armadilha principal, B = armadilha secundária, C = armadilha para purificação do gás de araste.

significantes para o seu comportamento; 4º) Identificação de trimetilamina na urina de criança como componente responsável pelo ofensivo odor de peixe no corpo; e 5º) Exame de voláteis de vinhos e aguardentes.

Murray testou quatro polímeros: Chromosorb 102, 105 e 106 e Tenax GC. Escolheu Chromosorb 105 pois este apresentava um "background" baixo e estável. Chromosorb 106 seria uma escolha alternativa, já que Chromosorb 102 apresentava um alto "background", devido à quebra térmica e oxidativa da resina. Tenax mostrava uma menor capacidade de adsorção do que Chromosorb 105 ou 106 e deixava passar componentes de volatibilidade média.

Em 1977, Kuo *et al.* (33) examinaram a eficiência da técnica de captura em polímeros porosos-desorção térmica para determinar voláteis orgânicos polares, solúveis em água. Alguns desses compostos são potencialmente tóxicos ou são precursores de muitos outros compostos tóxicos formados no processo de desinfecção por cloro em água potável. Seu estudo investigou a eficiência da recuperação para compostos modelos. Os principais fatores examinados foram temperatura do processo, material adsorvente, saturação do adsorvente e temperatura de desorção. Para a desorção dos voláteis, a armadilha era conectada à unidade de injeção, uma jaqueta de aquecimento era deslizada sobre ela e a válvula era girada para hélio purificado carregar os voláteis orgânicos termicamente desorvidos da armadilha para a coluna cromatográfica. Os adsorventes estudados foram Chromosorb 101 e Tenax GC. Perceberam que ocorria deslocamento e perda de ál

coois de baixo peso molecular em Tenax GC. Esse resultado coincide com os resultados anteriores de Butler e Burke (5). Tenax foi escolhido como adsorvente, porém, por causa de sua eficiência de desorção, como por sua alta estabilidade térmica. As eficiências de adsorção e desorção foram 75% e 80%, respectivamente, para a maioria dos compostos estudados. Os limites de detecção foram ao nível de ppb. Os autores concluíram ainda que apesar da alta sensibilidade da técnica na determinação de voláteis orgânicos polares, ela tem que ser aplicada com muito cuidado.

Yabumoto *et al.* (63) isolaram e identificaram 47 constituintes voláteis de melão ("cantaloupe"), assim como estudaram sua biogênese. Usaram 3 técnicas diferentes para o isolamento: captura em Porapak Q, destilação - extração usando o aparelho de Nickerson e Likens (39) e análise direta do gás da cavidade. Perceberam nítida diferença entre os três cromatogramas. Assim, o gás da cavidade exibia grande quantidade dos voláteis de menor ponto de ebulição. O polímero era menos eficiente para capturar etileno, acetaldeído, acetato de metila e etanol. Além disso, o etanol não estava presente na essência obtida de Porapak, mas uma grande concentração era exibida pelo gás da cavidade. Já em destilação - extração, o pico do solvente obliterava a porção inicial do cromatograma. Acetato de etila e etanol não representavam a quantidade total desses dois componentes no tecido do melão, sendo que a recuperação desses compostos não foi completa após os trinta minutos de destilação, que foi suficien

te, no entanto, para uma recuperação essencialmente completa dos outros constituintes voláteis. A quantidade dos outros alcoóis estão em acordo tanto na essência de Porapak como em destilação - extração mas difere da do gás da cavidade, que mostra apenas traços desses alcoóis de maior peso molecular. Isso podia ser explicado pelo fato dos álcoois estarem mais fortemente associados à fase aquosa do que ésteres. Exceto para etanol, que estava presente em grandes quantidades, a contribuição dos alcoóis para a pressão de vapor nesse sistema fechado não foi suficiente para o isolamento de quantidades detectáveis. No caso de amostragem de "headspace" não equilibrada, a contínua exaustão da câmara da amostra por períodos extensos podia recuperar suficiente quantidade de componentes de baixa pressão de vapor para detecção, porém em razões diferentes do que naturalmente ocorriam no "headspace" em equilíbrio.

Ainda em 1977, Jennings e Filsoof (27) continuaram a comparação das técnicas de preparação de amostra para cromatografia gasosa tanto para sistemas modelo como para sistemas reais. As técnicas estudadas foram: "direct headspace analysis", destilação - extração e captura por Porapak Q ou Tenax GC. Nos polímeros empregaram duas técnicas de desorção: desorção reversa a 100°C por 5 minutos em um capilar de vidro resfriado por gelo seco e eluição por solvente. Como sistema - modelo foram escolhidos componentes que representassem grupos funcionais e pontos de ebulição diferentes: etanol, 2 pentanona, n-heptano, 1 pentanol, 1 hexanol, formato de n hexila, 2 octanona, d limoneno, acetato

de n heptila e γ heptalactona. Nas condições usadas nesse estudo (15 minutos de captura com 30 ml/min. de nitrogênio) nenhum dos cromatogramas obtidos por captura em polímero, assemelhavam-se ao cromatograma obtido por "direct headspace", o qual apresentou maior quantidade dos três componentes mais voláteis. Limoneno, acetato de heptila e heptalactona dominaram os cromatogramas obtidos por Porapak Q e Tenax GC em ambas as técnicas de desorção, porém, as razões foram diferentes. Os cromatogramas por destilação-extração foram os mais semelhantes àqueles obtidos pela injeção direta da solução modelo. A eficiência da recuperação dos voláteis por desorção térmica dependia da temperatura.

Com produtos enlatados de porcos, poucos componentes voláteis foram observados em destilação-extração, talvez devido ao desaparecimento de alguns componentes durante a remoção do solvente por evaporação. Nas três técnicas, as razões dos componentes individuais são relativamente comparáveis. Porapak Q, com sua maior capacidade, dá uma essência mais concentrada. Comparando amostras de vinho, vê-se reduzida quantidade de álcoois de baixo peso molecular em Porapak, apesar de sua alta capacidade geral. Nas amostras de pêssego, etileno dominava o cromatograma obtido por "direct headspace", mas estava ausente naqueles obtidos pelas outras duas técnicas. Porapak Q exibia maiores quantidades de componentes de menor ponto de ebulição do que destilação-extração. Os autores terminaram concluindo que nenhum sistema de amostragem é uniformemente satisfatório, mas dependendo da amostra e do que o pesquisador deseja estudar, um

sistema ou outro pode ser superior.

Vitzhum e Werkhoff (54) avaliaram o aroma de café, chá e cacau. Assim, os componentes voláteis dessas amostras ou suas suspensões aquosas foram arrastados por hélio purificado e aspirados em uma coluna de Tenax por uma bomba na velocidade de 0,5 l/min. A armadilha foi colocada na entrada do cromatógrafo e, usando um sistema de injeção "splitless", os voláteis aquecidos a uma temperatura de 150°C foram transferidos à coluna capilar, resfriada a -60°C. Fizeram uma comparação com os cromatogramas de café moído torrado obtido por essa técnica e por destilação (com arraste a vapor). Poucos voláteis de baixo ponto de ebulição apresentavam-se nos cromatogramas obtidos por destilação porque a maioria deles foi perdida durante o isolamento. A técnica de polímeros porosos resultou em um grande número de compontes de baixo ponto de ebulição o que aproximava a impressão do aroma de café fresco. Resultados análogos foram obtidos para o chá. Os autores explicaram a escolha de Tenax pelas seguintes propriedades: 1) baixo poder de adsorção, permitindo a desorção térmica de compostos com alto ponto de ebulição; 2) excelente estabilidade térmica; 3) não reação com os compostos voláteis; 4) ausência de produtos voláteis.

Em 1977, Williams & Strauss (60) adaptaram o procedimento de Murray (38) para concentrar os voláteis do "headspace" de bebidas alcoólicas. Para a desorção dos voláteis, coletados em Chromosorb 105, usaram igualmente um complicado sistema de desorção. Uma armadilha de 10% de óleo de silicone (SF₉₆) em

Chromosorb A, similar em dimensões à armadilha de Chromosorb 105, era conectada a esta última. A armadilha de Chromosorb 105 foi colocada num forno cilíndrico para aquecimento à temperatura de 160°C e o tubo de SF_{96} foi resfriado por N_2 líquido. Os voláteis eram então desorvidos pelo calor e condensados imediatamente na armadilha de SF_{96} . Uma extremidade do tubo de SF_{96} era ligada a uma linha externa de gás nitrogênio, que arrastava os voláteis desorvidos termicamente ao cromatógrafo através de uma agulha soldada na outra ponta do tubo. Observaram, como Murray, um pequeno "background" de Chromosorb 105. Estudaram a influência do fluxo do gás e do tempo na desorção dos compostos, enfatizando a importância de usar condições adequadas de desorção para evitar a retenção seletiva de alguns voláteis da bebida na armadilha de Chromosorb 105, daí distorcendo a balança dos voláteis individuais do aroma. Mostraram a alta reprodutibilidade do método para nove componentes de "flor sherry", e a sua sensibilidade para componentes traços, tanto para amostras ricas em voláteis como vinhos e aguardentes quanto para material relativamente livre de aroma como "grape spirit".

Jennings (25) estabeleceu a identidade dos constituintes voláteis de figo. Estudou quatro variedades de figo e elas apresentavam apenas diferenças quantitativas. Entretanto as diferenças quantitativas entre as amostras de uma mesma variedade foram tão grandes quanto variações entre variedades. Nessa pesquisa, observou também que algum material com forte aroma, que sugeria a presença de aldeídos, passava através da armadilha. Ao passar

o efluente em solução de dinitrofenilhidrazina, um composto amarelo se precipitava (dinitrofenilhidrazona) e por análises subsequentes chegou à conclusão de que o composto era acetaldeído.

Em 1978, Boyko *et al.* (4) investigaram por cromatografia gasosa-espectrometria de massa o sabor de milho congelado ou enlatado, também usando aprisionamento em polímeros porosos, desorção térmica e transferência em tubo resfriado e finalmente introdução direta ao cromatógrafo. Os autores salientaram que o isolado produzido se assemelhava mais ao aroma percebido pelo nariz do que isolados de outros métodos como destilação, extração, etc., considerando a captura em polímeros porosos como uma técnica muito útil para pesquisar o aroma de vegetais. Foram observadas diferenças qualitativas e quantitativas devido às variedades, tanto na amostra enlatada como na congelada.

Preliminarmente, Boyko *et al.* investigaram o comportamento de alguns componentes típicos do sabor em Porapak Q, Chromosorb 102 e Tenax GC. Os tempos de retenção eram similares em Porapak Q e Chromosorb 102, porém consideravelmente menores em Tenax. Portanto, durante a etapa de remoção de água ocorria grande perda dos componentes de menor ponto de ebulição na armadilha de Tenax GC. Porapak Q foi então escolhido para amostras de vegetais desde que estavam interessados em compostos com uma grande faixa de ponto de ebulição.

Heide *et al.* (24), observando que por destilação-extração os componentes mais voláteis de cognac eram perdidos, ressaltaram

que os resultados assim obtidos deveriam ser compensados por informações dadas pela técnica de captura em polímeros porosos. Para eliminar a grande quantidade de vapores de água e etanol, aproveitaram o baixo volume de retenção desses dois componentes em Chromosorb 102. A água podia ser completamente removida, usando um arranjo de tubos com diferentes quantidades de adsorvente e um excesso de N₂ nas etapas de eluição. Partiram de 90ℓ de cognac, identificando 32 componentes mais voláteis do "headspace". Com o uso de "headspace analysis" junto com extração-destilação, foi possível a identificação de 339 constituintes, 193 dos quais não tinham sido previamente detectados em cognac.

Ainda em 1978, Willians *et al.* (59) estudaram os voláteis de cidra fermentada. N₂ purificado com um fluxo de 50 ml/min borbulhava através da cidra e passava através do Porapak Q, impregnado com 1% de Carbowax. Os voláteis eram desorvidos termicamente a 150°C, com passagem de N₂ a 30 ml/min e transferidos por uma agulha hipodérmica a um tubo de vidro. Depois de aproximadamente 30 minutos, éter era adicionado ao começo da agulha e o conjunto agulha-tubo de vidro era centrifugado para dirigir o material ao fundo do tubo. Foram detectados 105 componentes voláteis de cidra. Uma grande quantidade de informações foi obtida principalmente dos componentes mais voláteis, em comparação com os resultados previamente obtidos por destilação-extração. Do ponto de vista quantitativo, Porapak Q salientou as quantidades de ésteres e compostos não polares em relação aos álcoois mais polares. Além de minimizar a quantidade de etanol, o isola

mento dos voláteis na fase de vapor em Porapak Q também reduziu as quantidades relativas dos álcoois maiores possibilitando a detecção de componentes menores. Os autores afirmaram que as concentrações relativas dos componentes muito voláteis se aproximavam àquelas presentes no ar acima da cidra, o que está mais diretamente relacionado com respostas sensoriais do produto.

Os constituintes voláteis de hidrolizados proteicos de vegetais foram isolados por Withycombe *et al.* (61). Para a coleta dos voláteis, helio purificado mantido num fluxo de 60 ml/min, passava pela amostra a um condensador e finalmente ao tubo de Tenax. Os voláteis foram prontamente transferidos por desorção reversa, com a passagem de hélio a 15 ml/min, a um tubo de vidro resfriado por N₂ líquido. O tubo capilar foi selado e centrifugado para que os voláteis ficassem na sua ponta cônica, permitindo sua fácil remoção por uma seringa.

O interesse do trabalho de Withycombe *et al.* reside no fato de ter comparado por avaliação sensorial os voláteis recuperados de Tenax GC, Chromosorb 105 e Porapak Q. Das três resinas investigadas, os autores afirmaram que Tenax forneceu 60% mais isolado do que as outras e foi a que melhor reproduziu as características sensoriais. Tal fato contradiz as conclusões anteriores de Boyko *et al.* (4) que optaram por Porapak Q, pelo fato desse polímero ter produzido isolados que se assemelhavam mais ao aroma percebido pelo nariz. O perfil qualitativo e quantitativo das três resinas foram considerados quase superponíveis,

com exceção de três picos não identificados no final do cromatograma isolado de Porapak Q, os quais foram considerados produtos da degradação da resina, embora não fosse apresentada nenhuma evidência para tal alegação. Em adição, um número de compostos traços apareceram no cromatograma entre 40 e 60 minutos nesta mesma amostra, e foram considerados também como produtos da decomposição. Os autores chamaram a atenção para a necessidade de mostrar que a resina escolhida produzia um isolado característico organolepticamente.

Ainda em 1978, Singleton & Pattee (47) estudaram os componentes voláteis produzidos por reações catalizadas por lipoxigenase. Desenvolveram uma técnica bastante atraente por sua simplicidade e economia. Como armadilha usaram o próprio tubo guia do cromatógrafo (8,3 x 0,4 cm), 1,3 cm do qual foi empacotado com Porapak Q. Usaram um frasco de fundo redondo como frasco de reação, equipado com uma torneira para permitir que a reação fosse isolada do sistema de captura (Figura 3). O sistema inteiro foi ligado a uma trompa de água. A reação se processava por um certo tempo, depois a torneira era aberta e os voláteis arrastados à armadilha por 10 minutos mediante sucção. A armadilha era então removida e inserida no injetor do cromatógrafo. Os autores salientaram que o método não requeria nenhuma fase de desenvolvimento ou desorção reversa em tubos capilares resfriados antes da análise. Estudaram os voláteis produzidos de homogenados de amendoim e soja, na presença de lipoxigenase, em 30 minutos de reação sendo que os principais voláteis formados eram pentano,

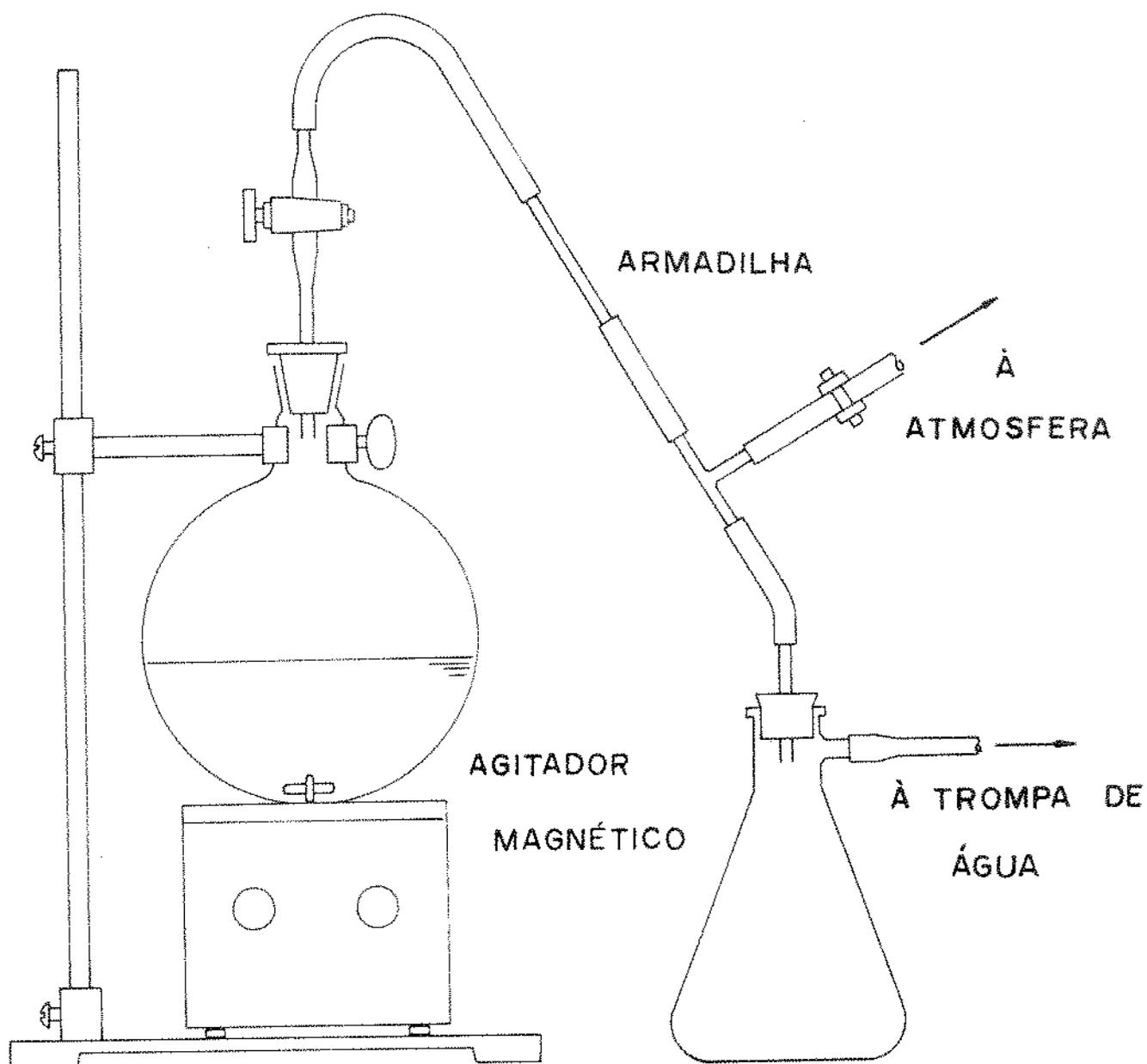


Fig. 3. Sistema para captura em polímero poroso dos voláteis do "headspace" segundo Singleton e Pattee (47).

pentanal e hexanal. Pela quantidade desses componentes e pela presença de alguns voláteis, os dois cromatogramas obtidos eram perfeitamente distintos, mostrando que o método era sensível o suficiente para diferenciar amostras. Os picos, porém não foram bem simétricos e bem resolvidos (Figura 4). Pentano era um problema cromatográfico devido à sua alta concentração, obliterando parte do cromatograma. Esse problema foi resolvido pelo aumento do tempo de coleta, permitindo que o pentano passasse pela armadilha. Os autores salientaram também que a armadilha, com os voláteis adsorvidos, podia ser guardada à temperatura ambiente por períodos extensos até serem analisados e não notaram nenhuma modificação nos cromatogramas mesmo depois de 70 horas.

Yabumoto *et al.* (65) ampliando seu estudo sobre melão, compararam quatro variedades dessa fruta por captura em Porapak Q e acompanharam o amadurecimento através dos voláteis do gás da cavidade. Foram discutidas as diferenças entre variedades e os perfis tomados pelos voláteis durante o amadurecimento. Comparando as duas técnicas, notaram a importância do método na coleta dos voláteis, pois etileno, acetaldeído e etanol foram picos proeminentes nas injeções diretas da cavidade da fruta, mas esses compostos não foram detectados nos concentrados de Porapak Q. Isso é coerente com a observação anterior de Jennings (25), segundo a qual esses componentes passavam pela armadilha, embora contradiga a observação de Withycombe *et al.* (61) que acetaldeído estava presente no isolado de Porapak Q.

Lund & Dinsmore (34) determinaram os voláteis de suco de laran

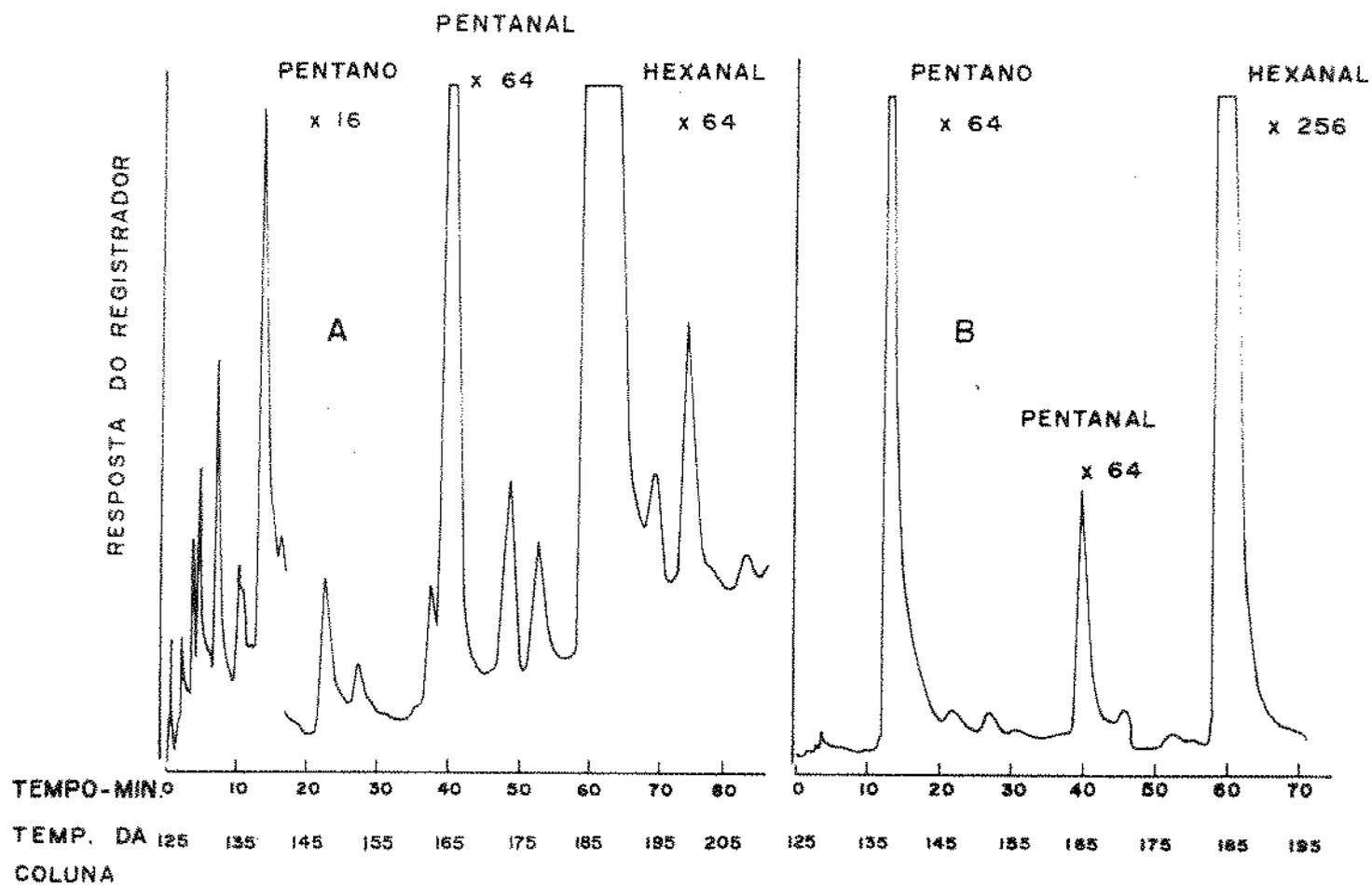


Fig. 4. Cromatograma dos voláteis produzidos de A) homogenizado de soja e B) homogenizado de amendoim, mediante lipoxigenase (47).

ja e "grapefruit" por "direct headspace analysis", que permitiu a determinação quantitativa apenas dos quatro voláteis mais proeminentes: metanol, etanol, acetaldeído e limoneno. Os de mais voláteis precisavam de uma etapa de concentração. O suco a 55°C era submetido a passagem de N₂ (100 ml/min), e os vapores eram obrigados a passar pela coluna de Porapak Q, e seguia-se a habitual fase de desenvolvimento na qual a água residual, etanol, acetaldeído e metanol passavam pela armadilha e o resto dos componentes podia ser então analisado sem a interferência desses componentes proeminentes. Os voláteis foram desorvidos reversamente a um tubo resfriado ou ao início resfriado da coluna cromatográfica. Muitos dos componentes menores, que foram enriquecidos pela técnica, contribuem para o sabor de citros ou para o "off-flavour". Portanto, a técnica forneceu informações muito úteis para avaliação da qualidade. Além disso, os perfis dos voláteis eram frequentemente característicos da variedade e grau de maturidade. Sugeriam, portanto, o uso da técnica para detecção de adulteração e estocagem inapropriada dos citros.

Em um artigo chamado: "Headspace Sampling: Use and Abuse" Wyllie *et al.* (62) ressaltaram a falta de atenção dada à influência dos adsorbatos e à manipulação da amostra na composição obtida por captura em polímeros porosos em comparação com o grande esforço dado às propriedades dos adsorventes. Uma preocupação principal era se os processos de adsorção e desorção foram quantitativos nas condições empregadas. Eles, então, investigaram vários aspectos da técnica usando um sistema-modelo con

tendo componentes escolhidos para fornecer um intervalo de volatilidade e funcionalidade similares aos que são encontrados em um sistema real. A composição do "headspace", determinada por captura em Porapak Q refletia a do "headspace" em equilíbrio quando a amostra era coletada por uma hora com um fluxo de 10 ml/min. de N_2 . Quando a coleta dos voláteis era continuada por 24 horas, uma composição completamente diferente do "headspace" era obtida. Portanto, a capacidade da armadilha, a velocidade do gás passando pela amostra e o tempo de coleta devem ser considerados cuidadosamente se é desejada uma composição refletindo a da amostra em equilíbrio. O vapor não poderia ser removido a uma razão mais rápida do que o equilíbrio pudesse ser mantido. Quanto à desorção, concluíram que o seu sistema era altamente eficiente, pois não havia mudanças nítidas quando o sistema modelo era aplicado diretamente a uma armadilha com lã de vidro e sujeita ao sistema de desorção-coleção. O sistema consistia no aquecimento da armadilha ($130^{\circ}C$), com um fluxo de N_2 (10 ml/min.) e a recuperação dos voláteis por meio de um capilar de vidro dobrado em ângulo reto, mergulhado em diclorometano, resfriado com gelo seco.

Considerando que a presença do solvente muitas vezes é indesejável, a eficiência de desorção ao vidro capilar resfriado com gelo seco foi também investigada. A composição da amostra recuperada foi bastante influenciada pela temperatura de desorção e fluxo do gás de arraste. À temperatura e fluxo maiores, a recuperação dos componentes mais voláteis era muito baixa mas,

à temperatura e fluxo menores, a composição estava em razoável acordo com aquela obtida por "direct headspace analysis" da solução modelo. O sistema modelo era aplicado com uma seringa diretamente no polímero para estudar apenas as características de desorção, evitando a etapa de coleta dos voláteis.

Foram comparadas também desorção normal e desorção reversa. A composição das amostras eluídas por desorção normal mostrou alguma perda dos constituintes menos voláteis, principalmente em Porapak Q, com considerável perda de limoneno. A perda de limoneno não foi notável na eluição por desorção reversa. Foram percebidas também as características superiores de desorção de Tenax GC para compostos de maior ponto de ebulição, o que já tinha sido salientado por Butler and Burke (5). A completa falta de etanol na essência obtida de Tenax por desorção reversa reflete a baixa adsorção de Tenax para alcoóis menores.

Dupuy *et al.* (13) descreveram um método que não requer pré-enriquecimento dos voláteis e, de acordo com os autores, é rápido e eficiente. Seu método fez uso do próprio injetor do cromatógrafo (a 170^o) para efetuar a separação dos voláteis dos não-voláteis. A amostra foi colocada no próprio tubo guia do injetor onde era segura por lã de vidro. Os voláteis foram rapidamente arrastados da amostra com o gás transportador do cromatógrafo e foram adsorvidos na porção inicial da coluna, mantida a 30^oC. O tubo guia era então removido da entrada e a temperatura da coluna aumentada a 100^oC em 5 minutos. Assim analisaram amostras de óleo de soja com notas atribuídas conforme uma esca

la de sabor, e mostraram que a qualidade do sabor também podia ser medida pelo instrumento. A comparação entre cromatogramas de duas amostras de óleo, com uma diferença na escala de sabor de apenas 1,5 unidades, revelou a sensibilidade desse método direto de cromatografia gasosa. O método já foi aplicado aos voláteis de óleo de salada (14). Não foi avaliada, porém, a reprodutibilidade do método e sua habilidade em manter a composição original da amostra. Existe também a possibilidade de que os não voláteis, na alta temperatura usada no injetor do cromatógrafo, possam degradar ou reagir dando origem a compostos voláteis, aumentando o nível de ruído e deslocando a linha base. Provavelmente por isso, faltaram simetria, resolução e separação aos picos nos cromatogramas obtidos por Dupuy *et al.* (13). A aplicação do método também às amostras aquosas é questionável, devido aos problemas que a água pode causar na análise cromatográfica, os quais já foram discutidos anteriormente.

Em 1979, Noble *et al.* (40) desenvolveram uma técnica para a coleta dos voláteis do "headspace" de vinho por deslocamento (Figura 5). A amostra foi colocada em um frasco (frasco B) a 20°C por 20 minutos. Depois do tempo de equilíbrio, N₂ foi introduzido num outro frasco (frasco A), colocado numa altura superior ao primeiro e contendo o vinho de deslocamento. O N₂ com um fluxo de 20 ml/min. controlava o fluxo de 500 ml do vinho do frasco superior para o inferior. Os voláteis eram então deslocados do "headspace" do frasco B e adsorvidos em Tenax GC. Seguiu-se a fase de desenvolvimento para eluição de água e etanol. Os vo

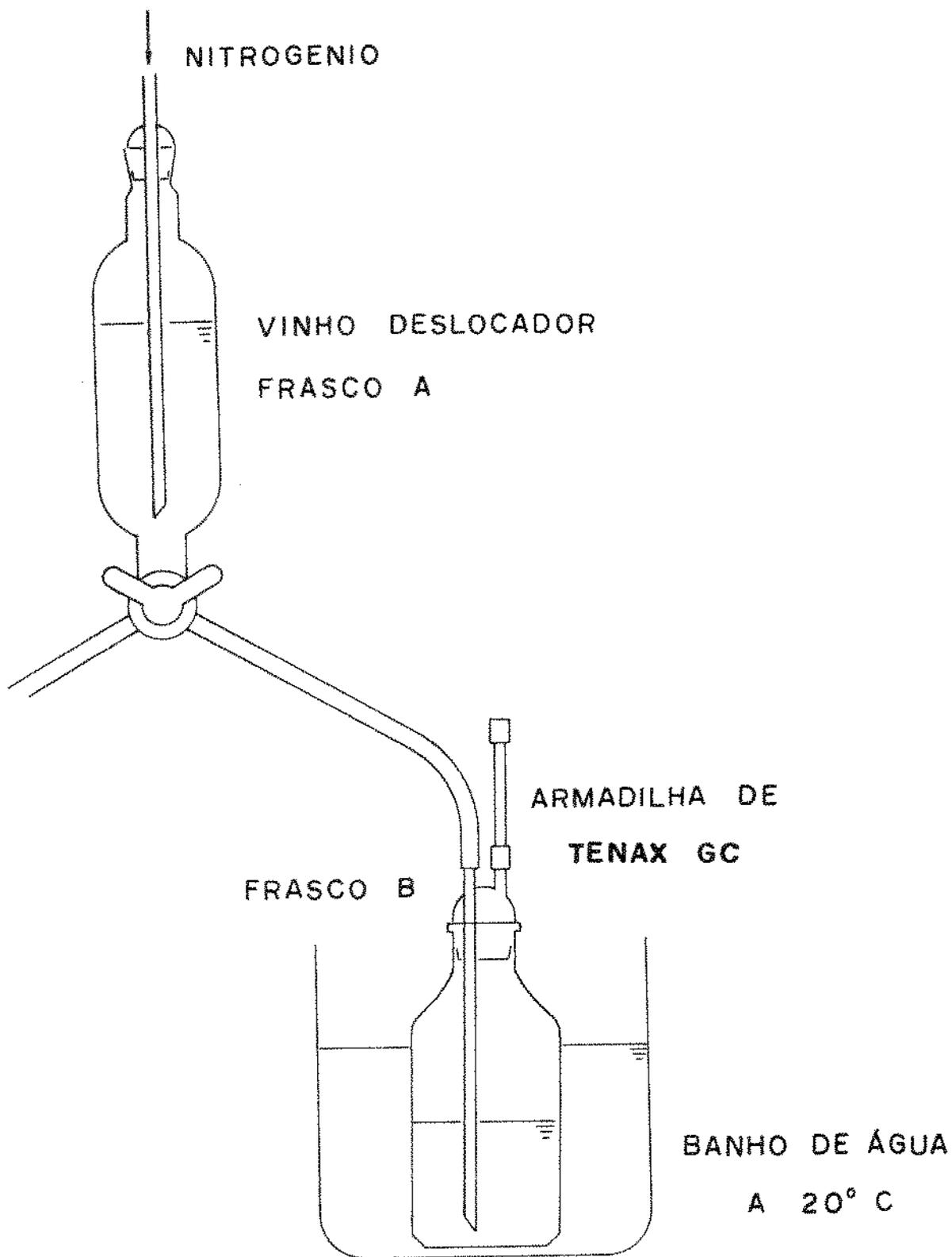


Fig. 5. Sistema de coleta dos voláteis de vinho por deslocamento segundo Noble et al. (40).

lâteis eram desorvidos por aquecimento da armadilha, com pas
sagem de N_2 , para se condensarem em uma serpentina imersa em um
banho de etanol-gelo seco. Foram feitas corridas triplicadas pa
ra avaliar a precisão do método, conseguindo alta reprodutibili
dade especialmente para os picos maiores.

Simpson (46), em 1979 estudou a influência do volume do gás de
arraste na composição dos voláteis de vinho. Amostras de 150
 cm^3 de vinho foram submetidas à captura dos voláteis em Chromo
sorb 105, com um fluxo de N_2 de 30 ml/min. A técnica usada foi
a de Williams e Strauss (60). Os volumes usados do gás de ar
raste variaram de 5 a 30 ℓ . O autor verificou pelas áreas de 13
componentes (identificadas anteriormente em outro trabalho) que
a composição quantitativa variava conforme o volume usado do
gás de arraste. As concentrações relativas dos voláteis se apro
ximavam mais das concentrações de equilíbrio quando usava o vo
lume de 5 ℓ , enquanto a concentração relativa dos voláteis para
o volume de 30 ℓ apresentava uma grande diferença da composi
ção estimada dos voláteis para o vinho original.

Para verificar a retenção dos voláteis no polímero, foram
usadas duas armadilhas em série em vez de uma única armadilha .
Com um volume de 30 ℓ do gás de arraste, quatro dos quatorze
componentes voláteis do vinho foram encontrados na segunda ar
madilha. Quando o autor repetia a experiência com uma amostra
da mesma garrafa de vinho, considerando somente a primeira arma
dilha, ele conseguia replicar os valores obtidos apenas para
seis componentes.

Simpson sugeria que, apesar do material representativo do "head space" em equilíbrio ser mais apropriado para correlações sensoriais, o material enriquecido ou deficiente de componentes mais voláteis e mais hidrofóbicos podia ser útil na identificação. Por exemplo, quantidades de éteres formados como produtos de fermentação podem ser reduzidos para permitir o exame de componentes menores, porém significantes para o aroma.

As relações entre as quantidades relativas dos componentes e os volumes do gás de arraste foram empiricamente lineares. Consequentemente, segundo o autor, a composição calculada por extrapolação a um volume zero de nitrogênio deveria aproximar-se da composição do "headspace" em equilíbrio do vinho original, a 28°C.

3.2. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é, sem dúvida, o método analítico mais usado atualmente, aplicada em uma gama abrangente de produtos alimentícios. Ao mesmo tempo, como foi salientado por Jennings (36), é o método onde ocorreram mais abusos. Os artigos publicados empregando esta técnica variam grandemente em confiabilidade.

A cromatografia gasosa é imprescindível na pesquisa do sabor. Inicialmente colunas empacotadas foram usadas. Porém colunas de baixa resolução não são compatíveis com amostras complicadas, consistindo de numerosos voláteis com volatibilidade e grupos

funcionais marcadamente diferentes. O uso de coluna capilar de alta resolução (pratos teóricos em torno de 50.000, em comparação aos de 5.000 - 6.000 das colunas empacotadas) junto com programação de temperatura satisfazem as exigências dessas amostras. Contudo, colunas capilares possuem uma deficiência inerente - o tamanho da amostra que pode ser introduzido é muito limitado. Portanto, é necessário o uso de um "splitter" no injetor do cromatógrafo.

Em uma coluna capilar, a amostra deve ser introduzida em uma banda mais estreita possível devido ao baixo fluxo do gás de arraste. O alargamento das bandas iniciais serão pronunciadas se essa precaução não for tomada. A escolha da fase líquida desempenha um importante papel na obtenção de um bom cromatograma. Carbowax e SF 96 CO 880 são duas fases líquidas comumente usadas na separação dos voláteis.

Recentemente, colunas capilares de vidro foram introduzidas (26) e pesquisadores nessa área estão mudando para essa coluna. Valores de 200.000 pratos teóricos ou mais podem ser conseguidos. Além da alta eficiência, essa coluna também tem a vantagem de diminuir a degradação de certos compostos durante o processo cromatográfico.

3.3. Identificação dos Voláteis

Espectrometria de massa é amplamente empregada para identificação de componentes individuais, principalmente quando o aparelho

lho é conectado diretamente ao cromatógrafo a gás, pois permite alta utilização da amostra e grande rapidez de análise. Além disso, a quantidade necessária para se obter um bom espectro está no mesmo nível medido pelo cromatógrafo, assim 1 µg pode dar um espectro útil (41).

O problema mais significativo do sistema combinado cromatógrafo gasoso - espectrometria de massa é que o cromatógrafo é operado com uma pressão de saída de 1 atm. (760 Torr) e o espectrômetro de massa deve ser operado a uma pressão de 10^{-7} Torr. O sistema de interfase deve reduzir a pressão do gás de arraste por 8 ordens de grandeza e ainda conduzir frações úteis da amostra orgânica ao espectrômetro.

Embora cromatografia gasosa - espectrometria de massa seja o sistema mais útil na identificação em pesquisa do sabor, frequentemente a completa estrutura do composto não pode ser elucidada com os dados de espectrometria de massa e surge a necessidade de se obterem mais dados espectrométricos como infravermelho, raman ou ultra-violeta. Para se obter esses dados a amostra deve ser coletada em alguma espécie de armadilha e transferida à célula específica do espectrômetro (45).

Espectrometria infra-vermelho é aqui de grande valia para identificação dos grupos funcionais. O maior problema em infra-vermelho é que o tamanho médio da amostra manuseada no cromatógrafo gasoso analítico é consideravelmente menor do que o normalmente usado nesse tipo de espectrometria. A requisição da amo

tra varia de 1 μg para uma banda forte e 100 μg para uma banda fraca no caso de uma célula de seção de 0,1 cm^2 . As dificuldades em se obter bons espectros aumentam com amostras menores. A amostra pode ser introduzida no espectrômetro no estado líquido ou gasoso. A principal vantagem de amostras líquidas é que os espectros de líquidos são muito mais familiares do que os de gases e daí uma dada amostra poderá ser identificada por compilações gerais de espectros, ou por assinalação de diferentes bandas a determinadas estruturas moleculares. A principal vantagem de se usar amostras gasosas é que não há necessidade de condensação (45).

Inúmeras armadilhas e métodos para infra-vermelho são descritos na literatura (55, 22). Os mais comuns são: 1) condensação da fração em alguma espécie de tubo (micropipeta por ex.); 2) coleta da fração nos solventes comumente usados em infra-vermelho; 3) coleta da fração em uma coluna adsorvente.

Em geral os métodos de captura em armadilha são lentos e ineficientes para amostras pequenas devido a efeitos de aerosol, manuseio geral e problemas de transferência. Essa captura é particularmente difícil no efluente de colunas capilares, nos quais os picos seguem uns aos outros com apenas uns poucos segundos de separação. Outro problema comumente encontrado com amostras coletadas é oxidação ou polimerização do componente puro. Em uma solução diluída, compostos ativos são protegidos de auto-oxidação ou auto-polimerização, mas no estado puro reagem e daí destroem sua própria identidade (55).

3.4. Avaliação Sensorial

Devido a remarcáveis desenvolvimentos em cromatografia gasosa-espectrometria de massa assistimos desde 1960 a uma atividade considerável de pesquisa sobre a composição volátil de alimentos. Um número impressionante de compostos voláteis já foi identificado, até 1976 já tinham sido identificados 2.300 compostos (12). Infelizmente não houve um esforço correspondente na determinação da contribuição sensorial desses compostos apesar dos pesquisadores admitirem que as pesquisas de sabor só adquirem importância na medida em que os dados químicos são correlacionados com avaliação sensorial.

A avaliação da importância desses componentes para o sabor é, sem dúvida, muito complexa e ainda não houve nenhum desenvolvimento revolucionário das técnicas da avaliação sensorial. O julgamento humano deve ser usado em conjunção com o cromatôgrafo a gás para determinar quais compostos (se houver) contribuem para o aroma característico do produto. Deve ainda descrever a intensidade e qualidade dos picos individuais ou grupo de picos e determinar sua relação ao aroma de todo o isolado (52).

Investigações do aroma seriam grandemente simplificadas se certos voláteis do produto de interesse obviamente exibissem o aroma característico do produto estudado. Em tais casos, cheirar o efluente da coluna do cromatôgrafo pode fornecer fácil guia aos componentes de maior importância olfatória. A esses pode então ser dada atenção primária e sua identidade pode ser determinada.

Tais compostos são denominados compostos de caráter impacto, o aroma de cada uma dessas substâncias traz imediatamente à mente a fonte do produto (8). Como exemplo temos nona-2-trans-6-cis-dienal em pepino (19), e etil-2-metil-butirato em maçã (16) e etil-trans-2-cis-4-decadienoato em pera (28). Mas na maioria dos casos, tais compostos de caráter impacto não são encontrados. O aroma típico de um alimento parece ser mais uma resposta integrada a um número de compostos chamados contribuintes ao aroma.

Aproximações empíricas para a seleção e identificação de compostos contribuintes ao aroma podem obter sucesso. Se a apreciação nasal direta do efluente da coluna ("sniffing") não ajudar, a coleta sistemática e avaliação sensorial de frações podem ser de grande valor. Com sorte, pode-se às vezes encontrar a fração que contenha os componentes individuais indispensáveis ao aroma (52).

Em tais esforços é melhor usar uma coluna de menor resolução pois uma coluna altamente eficiente pode separar os componentes de tal maneira que o aroma devido à interação desses componentes pode não ser notado (52). Em avaliações desse tipo, é aconselhável avaliar o efluente total menos a porção do cromatograma de possível interesse. Picos cuja ausência causar uma diferença ao aroma são importantes. Para esses estudos, a seleção de um meio apropriado para avaliar os compostos suspeitos de serem contribuintes ao aroma é vital. O melhor é usar uma versão não aromática do produto sob estudo, ou seja, uma matriz

da amostra.

3.5. Estudos da Composição Volátil em Mamão e Cupuaçu

Existem alguns trabalhos na literatura sobre composição volátil de mamão (7, 17) e apenas um sobre cupuaçu (1), mas não temos conhecimento de trabalho sobre a composição volátil de graviola.

Cupuaçu foi estudada por Alves & Jennings (1) e, devido às regras que controlam importação nos E.U., as frutas chegaram ao país na forma de polpa ou suco enlatado. As frutas foram sujeitas a 85°C por 12 a 15 minutos e enlatadas. Os autores optaram então por destilação-extração e usaram uma unidade modificada de Nickerson e Likens. Para a separação dos componentes, usaram uma coluna capilar de vidro de alta resolução e obtiveram 50 picos no cromatograma. Os autores não identificaram todos os picos, pois não conseguiram localizar espectros semelhantes na literatura. Os compostos que possuem aroma agradável foram principalmente ésteres: butirato de etila, acetato de etila e isobutirato e butirato de butila. Os autores concluíram que esses ésteres contribuem para o aroma de cupuaçu e que o aroma típico da fruta não é devido a um composto, mas é uma resposta integrada a um largo número de compostos.

Flath & Forrey (17) estudaram os componentes voláteis de mamão fresco isolados por vários métodos de destilação. As frutas maduras, a julgar pela coloração externa e grau de maciez, foram analisadas por 4 métodos de concentração, usando de 4 - 7 kg da

amostra: A) destilação a vácuo com recuperação dos voláteis em armadilhas resfriadas com nitrogênio líquido; B) destilação-extração simultâneos a pressão reduzida; C) destilação a vácuo e depois extração com éter; D) destilação-extração simultâneos a pressão atmosférica. Este último concentrado apresentou um forte aroma de cozido.

Linalool era o componente maior em todos os extratos, seguido por isotiocianato de benzila. A quantidade dos componentes individuais variou consideravelmente entre os diferentes concentrados. Algumas das variações era devido provavelmente à variabilidade da amostra fresca. Entretanto, muitas das variações podiam ser correlacionadas com o tratamento recebido nas etapas de isolamento. Por exemplo, quando a polpa da fruta era deixada por longo período de tempo, antes e durante a etapa de isolamento, a concentração de isotiocianato de benzila aumentava em relação à concentração de linalool, como aumentavam também os óxidos de linalool. Altas temperaturas, ou a presença de ar, aumentavam a concentração de fenilacetoneitrila, presente em grande quantidade no concentrado D.

Flath e Forrey conseguiram detectar e identificar 106 compostos, porém, a maioria estava em concentração muito baixa. Apenas 4 componentes tinham concentração maior de 0,5% e os próprios autores admitiram a presença de vários compostos como artefatos.

Em outro artigo, Chan *et al.* (7) estudaram o desenvolvimento de "off-flavour" em purê de mamão. Ácidos butírico, hexanóico e

octanóico e seus ésteres metílicos foram encontrados em purê sem tratamento especial e eles apresentavam forte odor. Em purê preparado com acidificação e inativação de enzimas pelo calor não houve o desenvolvimento de tais compostos. Observaram também que o concentrado preparado pelo método comercial continha muito mais isotiocianato de benzila relativo à concentração de linalool, em forte contraste à fruta fresca.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Seleção da Matéria-Prima

Na avaliação da aplicabilidade do método de análise direta do gás da cavidade em frutas brasileiras, duas frutas foram escolhidas: cupuaçu (aroma forte) e mamão (aroma suave). Duas frutas também foram utilizadas na avaliação do método de captura por sucção em Porapak Q: graviola (aroma forte) e mamão (aroma suave).

Cupuaçu (*Theobroma grandiflora*) apresenta um gosto ácido e forte aroma. É usada para fazer sucos, sorvetes e doces. A fruta estudada tem procedência de Manaus.

Graviola (*Annona muricata*), cresce livremente no nordeste brasileiro. Seu sabor é ácido e, devido ao aroma e gosto intensos, é consumida sob a forma de refrescos e néctares. As frutas estudadas têm procedência de Recife e chegaram a Campinas por transporte aéreo, ainda verdes. À medida que atingiam plena maturidade (2 - 4 dias após chegada), eram então utilizadas. Foram usadas também duas marcas comerciais de suco de graviola (marca A e marca B) processados no Nordeste. Estes produtos foram adquiridos no comércio local e a amostragem foi ao acaso.

Mamão (*Carica papaya*) é uma fruta muito popular e seu consumo é feito geralmente ao natural. A fruta apresenta aroma e gosto suaves. Elas foram adquiridas no comércio local conforme a ne

cessidade, pois durante todo o ano havia disponibilidade de ma
mão em diferentes estados de amadurecimento.

4.2. Amostragem e Preparo da Amostra

Os sucos processados de graviola foram muito bem misturados e 100 g foram colocados no aparelho para a coleta dos voláteis. As frutas frescas e maduras de graviola foram divididas em quatro no sentido longitudinal e as sementes foram extraídas manualmente de duas secções opostas. A polpa foi batida com NaCl p.a. em um liquidificador e diluída com água até a obtenção de um Brix final igual ao suco processado (8^o Brix). O cloreto de sódio fora previamente aquecido em estufa a 150 °C por duas horas. Foi colocado 100 g do suco assim obtido no aparelho para a coleta dos voláteis.

Para obtenção das amostras de mamão, foi feito também um quartejamento e foram tomadas duas secções opostas. Após a eliminação manual das sementes, a polpa foi cortada em cubos e estes foram muito bem misturados com 30% de NaCl p.a. Trezentas gramas da amostra foram colocados no aparelho para a coleta dos voláteis.

4.3. Isolamento dos Voláteis

4.3.1. "Direct headspace analysis"

Foram colocados 100 g do suco de graviola processado em um ba
lão redondo de 1 ℓ, com agitação magnética durante duas horas. Para tampar o balão, na ausência de uma rolha de teflon, foi

usada uma rolha de borracha com um orifício central para permitir a entrada da agulha da seringa para gás, e essa rolha estava envolta completamente em papel alumínio para evitar adsorção dos voláteis na borracha. Cinco ml do vapor acima da amostra foram retirados por meio da seringa para gás e imediatamente injetados no cromatógrafo. A atenuação neste caso foi de 1 x 4.

4.3.2. Análise direta do gás da cavidade

Baseada na técnica de Yabumoto *et al.* (64), um tubo de vidro foi inserido na cavidade da fruta e sua extremidade externa foi selada com um septo a fim de permitir a introdução da agulha da seringa para gás. A parte do tubo de vidro em contato com a superfície da fruta foi imediatamente selada com uma resina de secagem rápida. Foram retirados 5 ml do gás da cavidade e imediatamente injetados no cromatógrafo.

4.3.3. Captura por sucção em Porapak Q

O sistema de captura foi baseado na técnica de Singleton e Pattee (47), com algumas modificações. Foi usado um vácuo de 0,64 psi para todas as amostras, um vácuo muito mais baixo do que o de 30 psi, usado por Singleton et Pattee.

A amostra foi colocada em um balão redondo de 1 ℓ e agitada leve e magneticamente. O balão foi conectado a uma armadilha de Porapak que, por sua vez, foi conectado a um kitassato e a uma trompa de água (Figura 6). Todas as conexões são de vidro ou tubos de teflon (PTFE) para evitar adsorção dos voláteis da

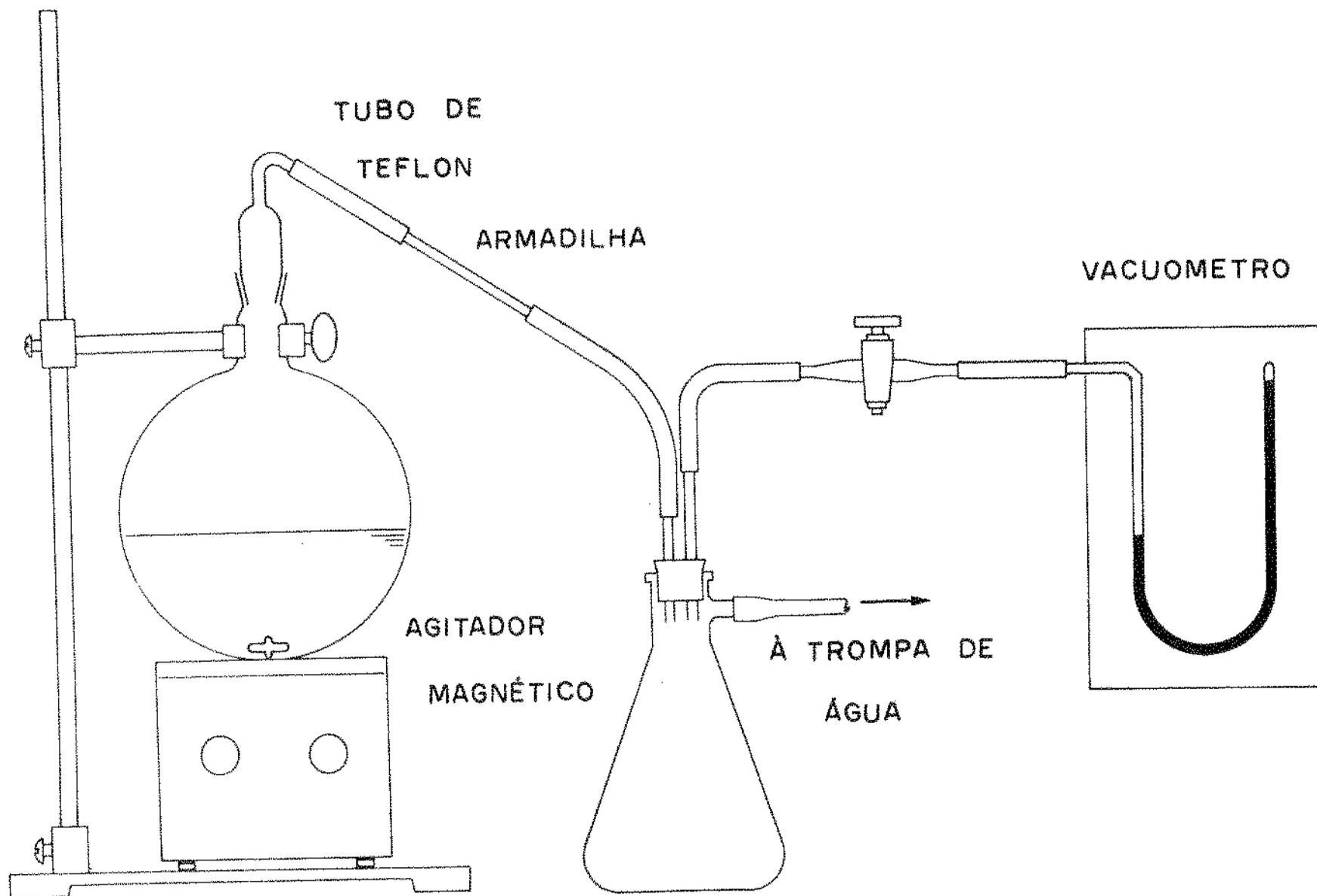


Fig. 6. Sistema de aprisionamento em Porapak Q por sucção, usado neste trabalho.

amostra em tubos plásticos e ou rolhas de borracha. Os voláteis da amostra foram arrastados por sucção à armadilha de Porapak Q, onde ficavam retidos por adsorção.

Para a armadilha foi usada uma coluna de borossilicato de vidro de 4 mm de diâmetro interno por 14 cm de comprimento, dos quais 4 cm foram empacotados com Porapak Q, retido entre mechas de lã de vidro silanizadas. Essa coluna normalmente serve como um tubo guia no injetor do cromatógrafo. Isso permite um eficiente condicionamento do Porapak Q pela simples introdução do tubo guia no injetor do instrumento. O condicionamento é feito a 200 °C, com um fluxo de nitrogênio de 30 ml/min, por duas horas.

As condições de captura neste trabalho, tais como comprimento da armadilha, volume do solvente e tempo de captura dos voláteis, diferem das de Singleton e Pattee e foram especificamente determinadas para cada tipo de amostra.

Para a desorção dos voláteis foram feitas duas tentativas: injeção direta e eluição por solvente. Injeção direta consiste na simples introdução da armadilha com os voláteis adsorvidos no injetor do cromatógrafo a 200°C. Das inúmeras tentativas feitas o que sempre ocorreu foi uma desorção gradativa, incompatível com os requisitos cromatográficos para obtenção de picos agudos e bandas estreitas. O grupo de Jennings *et al.* (62) também não conseguiu uma desorção suficientemente rápida dos voláteis para permitir uma boa resolução e separação dos picos no cromatograma.

O meio de desorção escolhido foi eluição por solvente usando éter etílico de alto grau de pureza, Merck, para análises espectrográficas. O solvente foi aplicado em mínima quantidade no topo da armadilha de Porapak e pressão pneumática de uma seringa para gás era aplicada a fim de forçar o solvente mais os voláteis para a parte inferior da armadilha, onde eram coletados em um tubo de ensaio resfriado a 0 °C. Foram tomados 4 µl da solução de voláteis com uma seringa de 10 µl e imediatamente injetados no cromatógrafo.

4.4. Cromatografia Gasosa

O aparelho usado foi um cromatógrafo a gás Perkin Elmer modelo 990 com detetor de ionização de chama. O cromatógrafo foi adaptado para uso de coluna capilar, necessitando a introdução de um "splitter" Perkin-Elmer nº 009.0598 com um restritor nº 1 no injetor. A coluna utilizada foi uma coluna capilar (WCOT) de aço inoxidável de alta resolução, de 500 pés de comprimento por 0.02 polegadas de diâmetro interno. A fase líquida escolhida foi óleo de silicone SF 96 contendo 5% de Igepal CO 880.

As condições da análise foram: fluxo de N₂, 8 ml/min, fluxo de ar, 300 ml/min, e fluxo de H₂, 30 ml/min. A temperatura do injetor e do detetor foi de 200°C. A coluna foi mantida isotermicamente a 60°C por 24 minutos e a programação de temperatura foi então iniciada com um aumento de 1°C/min até atingir a temperatura final de 110°C e a coluna foi mantida nessa temperatura até o final da análise. A menos que seja especificado, a atenuação foi 1 x 8.

Uma coluna capilar de Carbowax também foi testada, mas a separação e a resolução dos picos foi inferior à coluna SF96C0880.

4.5. Determinação das Condições Ótimas para a Captura dos Voláteis de Graviola em Porapak Q.

Vários aspectos do método de isolamento foram investigados para determinar as condições ótimas, tais como (1) comprimento da armadilha; (2) volume do solvente; (3) duração da coleta dos voláteis; (4) necessidade da equilibrção da amostra antes da coleta; (5) direção da eluição dos voláteis durante a desorção. Para evitar a influência da variabilidade inerente das frutas e das transformações enzimáticas na composição dos voláteis, estes parâmetros foram avaliados usando o suco de graviola processado e as amostras para cada ítem foram retiradas de uma mesma garrafa.

O melhor volume de éter para a desorção dos voláteis foi selecionado para um determinado comprimento da armadilha. Foram testados 300, 400 e 500 μl de éter para 4 cm de comprimento da armadilha e 200, 300 e 400 μl de éter para 2 cm de comprimento, com o tempo de coleta dos voláteis fixado arbitrariamente em 1 h. Dessa série de 6 cromatogramas obtidos foi escolhido o melhor cromatograma. Fixadas as duas variáveis, comprimento e volume, foram testados os seguintes tempos de duração da coleta dos voláteis: 1/2, 1, 2, e 3 horas.

Para verificar a necessidade de equilibrção da amostra antes

da coleta, foram feitas duas tentativas. Na primeira, a amostra era deixada em repouso no balão do sistema de captura durante 1/2 hora e após esse tempo dava-se início à coleta dos voláteis. Na segunda tentativa, a coleta dos voláteis era iniciada imediatamente após a introdução da amostra no balão do sistema de captura.

Para verificar o efeito da direção de eluição dos voláteis durante a etapa de desorção foram testadas duas configurações da armadilha. Na primeira configuração, o solvente era aplicado no mesmo sentido em que os voláteis foram arrastados através do polímero (desorção normal). Na segunda configuração, o solvente foi aplicado no sentido inverso ao arraste dos voláteis através do Porapak (desorção reversa).

Além das variáveis descritas acima, a atuação enzimática em frutas frescas após o corte foi verificada por duas experiências. O suco proveniente de duas seções opostas de uma fruta de graviola, sem adição de sal, foi imediatamente submetido à coleta dos voláteis e análise cromatográfica. O suco proveniente das outras duas seções opostas foi misturado com 30% de NaCl e deixado em repouso por 4 horas antes de ser avaliado. A experiência foi repetida, invertendo a sequência de análise, isto é, a amostra com sal foi imediatamente analisada, enquanto a amostra sem sal ficava em repouso por 4 horas antes da análise.

4.6. Avaliação da Reprodutibilidade do Método de Isolamento.

Foram feitas três tentativas de avaliação da reprodutibilidade

do método de isolamento. Para cada tentativa, amostras duplicatas (100 g) de uma mesma garrafa de suco de graviola (marca A) foram submetidas à coleta dos voláteis por sucção em Porapak Q e análise por cromatografia gasosa. A reprodutibilidade foi avaliada pelos coeficientes de variabilidade, calculados a partir das áreas dos picos.

Para verificar a habilidade da técnica de captura por sucção em Porapak para concentrar os voláteis sem modificar as suas razões quantitativas, os cromatogramas obtidos por esta técnica foram comparados com os cromatogramas obtidos por "direct head space analysis".

4.7. Aplicabilidade do Método

4.7.1. Comparação do perfil dos voláteis em sucos frescos e processados de graviola.

Usando as condições ótimas de captura, determinadas especificamente para graviola, isolados de sucos frescos e de sucos comerciais A e B foram obtidos e submetidos à cromatografia gasosa. Foram analisadas 3 amostras de suco fresco, 4 de suco comercial A e 5 de suco comercial B.

4.7.2. Comparação do perfil dos voláteis de mamão em vários estados de amadurecimento.

Usando os outros parâmetros determinados para suco de graviola

(4 cm de comprimento, 300 μ l de éter) foram testados os seguintes tempos de duração para coleta dos voláteis de mamão: 4, 6 e 8 horas. Com o tempo escolhido, isolados de mamão no estado verde, intermediário e maduro foram avaliados. Pelo menos 6 amostras foram analisadas para cada estado de amadurecimento. A principal característica usada para classificação do estado de amadurecimento foi a textura. A fruta verde é dura ao tato e a fruta madura apresenta textura macia.

4.8. Avaliação Sensorial

4.8.1. Teste de preferência

As mesmas amostras de sucos frescos e processados de graviola foram submetidas à análise sensorial. Todas as amostras foram apresentadas aos provadores com 14^o Brix em béqueres devidamente codificados. O suco foi apresentado gelado, que é a temperatura em que o suco é normalmente consumido. Sendo a graviola uma fruta do norte, os provadores foram divididos em dois grupos: os nortistas, que conhecem a fruta e os sulistas, que não conhecem bem a fruta. O teste aplicado foi o de preferência em uma escala hedônica de 9 pontos, através de um delineamento em Blocos ao Acaso.

4.8.2. "Sniffing"

Em uma tentativa de determinar a contribuição sensorial dos picos individuais, foi feito um estudo preliminar por "sniffing". Para isso, uma saída através de um tubo de teflon foi colocado antes do detector afim de permitir que os componentes emergentes da coluna cromatográfica fossem cheirados individualmente. As concentrações limitantes dos compostos separados dificulta esse tipo de estudo. Portanto, ele é geralmente feito com o uso de um detector de condutividade térmica, pois é um detector não destrutivo e permite a passagem dos componentes pelo detector. Sua desvantagem é que os voláteis são cheirados bem quentes. Com o detector de ionização de chama, um "splitter" é colocado entre a coluna e o detector para dividir o efluente entre a saída e o detector. Para conseguir quantidades suficientes tanto para a detecção como para a cheiragem, os pesquisadores são obrigados a usar colunas com diâmetros maiores mas menos eficientes. Nesse trabalho, na ausência de um detector de condutividade térmica e para permitir o uso da coluna de alta resolução duas injeções das amostras foram feitas cada vez. A primeira foi usada para registrar o cromatograma. A segunda injeção foi feita para o "sniffing", seguindo o cromatograma já registrado. Fazendo as duas injeções uma atrás da outra diminuiu a possibilidade de erros introduzidos pela mudança dos tempos de retenção. Além disso, para cada amostra foram feitas 6 avaliações. O "sniffing" foi feito por uma equipe não treinada de 10 provadores, usando suas próprias palavras para a des

crição do aroma percebido. Cada provador cheirava durante 10 minutos para diminuir o efeito desagradável do nitrogênio na membrana nasal. Os provadores foram distribuídos de tal maneira a não cheirar a mesma região do cromatograma.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo dos Voláteis de Graviola

Das várias técnicas encontradas na literatura, a de Singleton e Pattee pareceu-nos particularmente atraente por sua simplicidade e economia, evitando o uso de nitrogênio ou hélio altamente puro para o arraste dos voláteis. A amostra usada por eles consistiu de apenas cinco componentes e faltaram simetria e resolução aos cromatogramas. Entretanto, a técnica em si nos pareceu perfeitamente aplicável a sistemas mais complexos como sucos ou frutas, desde que as condições de aprisionamento dos voláteis e da cromatografia gasosa fossem otimizadas.

5.1.1. Otimização do método de isolamento dos voláteis

Volume do solvente e comprimento da armadilha

Obviamente, para um determinado comprimento da armadilha existe um volume ideal do solvente para a desorção dos voláteis. O volume ideal do solvente é aquele que permite uma eluição eficiente dos voláteis sem uma diluição desnecessária da amostra. Essa dependência entre comprimento e volume é demonstrada na Figura 7. Evidentemente, o volume ideal para a armadilha de 4 cm é 300 μl e para a armadilha de 4 cm, 200 μl .

Tempo de coleta dos voláteis

Os cromatogramas na Figura 8 mostram um número limitado de volá

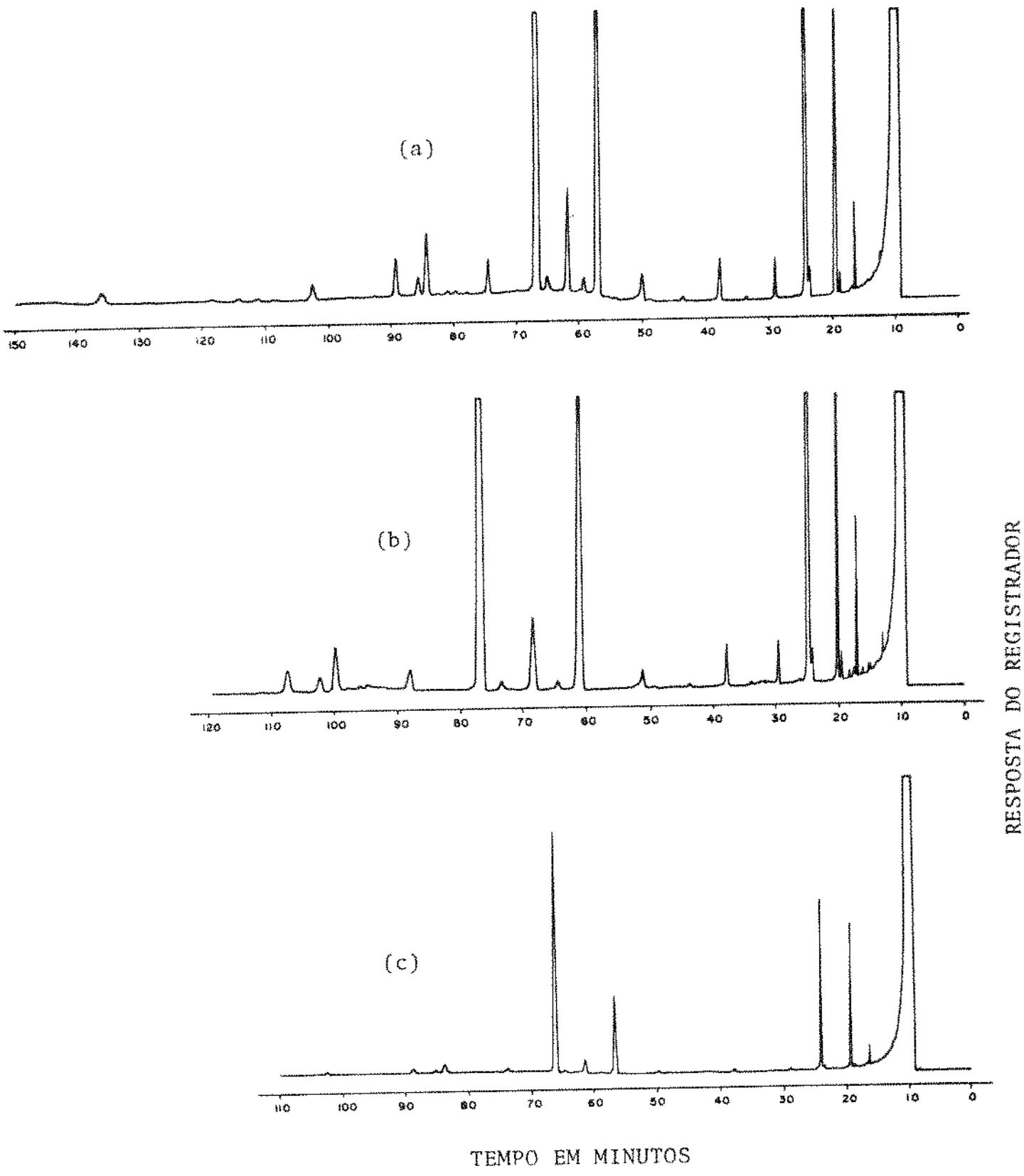


Fig. 7a. Cromatogramas ilustrando a relação entre o comprimento da armadilha (2 cm) e o volume do solvente: (a) 200 µl, (b) 300 µl, (c) 400 µl.

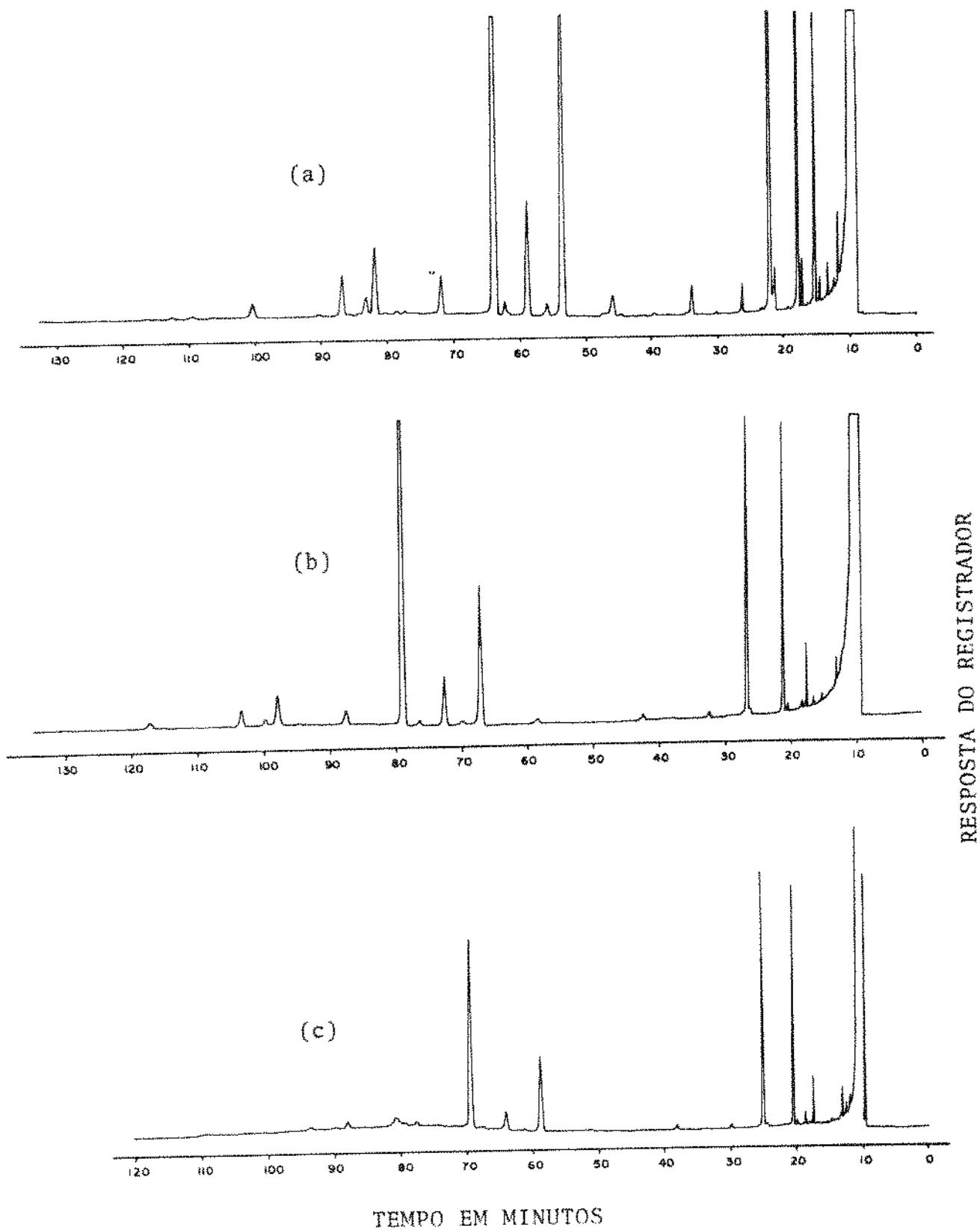


Fig. 7b. Cromatogramas ilustrando a relação entre o comprimento da armadilha (4 cm) e o volume do solvente: (a) 300 μ l, (b) 400 μ l, (c) 500 μ l.

Fig. 8. Cromatogramas ilustrando o efeito do tempo de coleta: (a) 1/2 hora, (b) 1 hora, (c) 2 horas, (d) 3 horas.

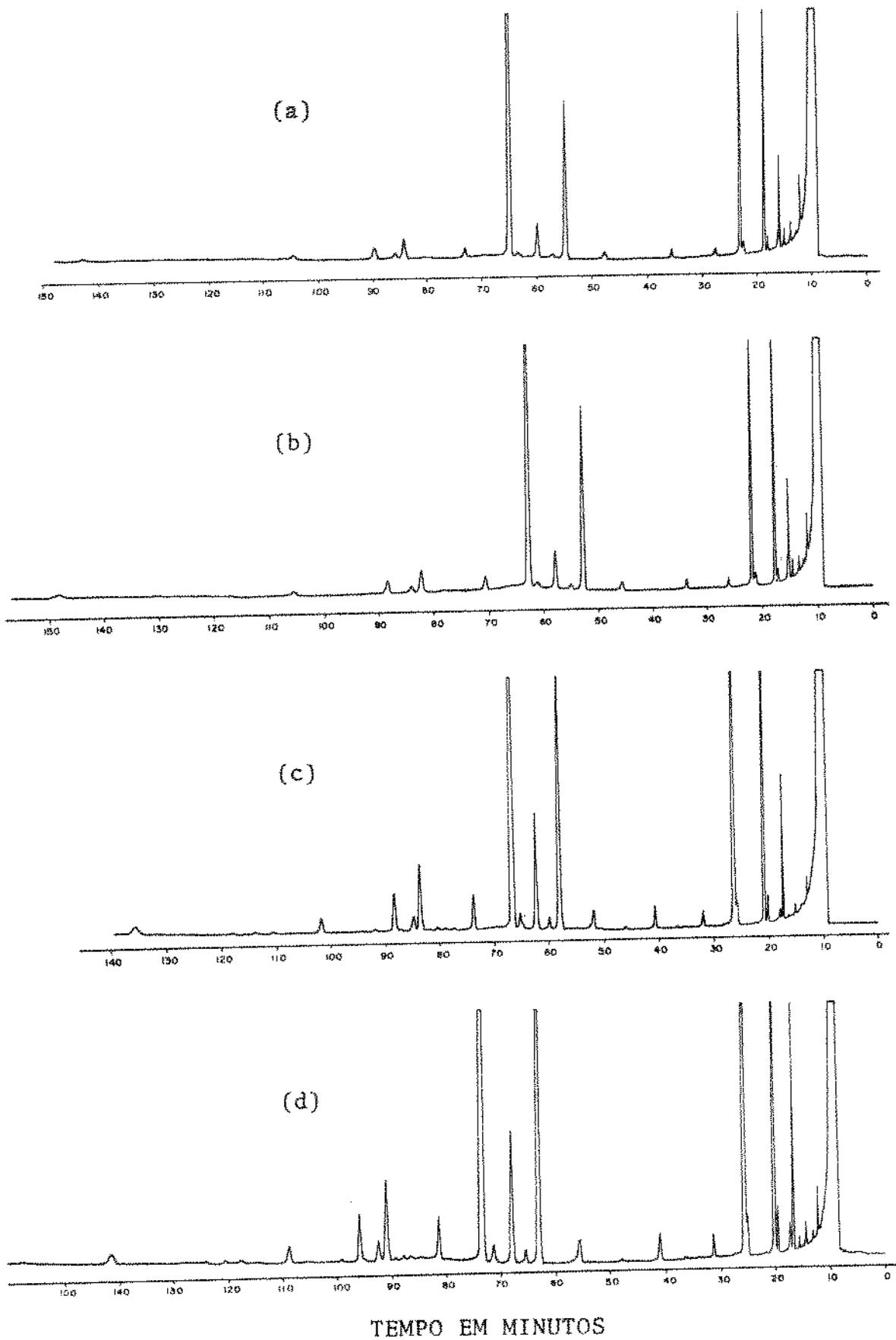


Fig. 8

teis após uma hora de coleta (29 componentes). Com duas horas de coleta apareceram 45 componentes, sem modificação das razões dos picos que já tinham sido detectados com menor tempo de coleta. Os picos apareceram um pouco maiores com 3 horas de coleta, mas com o mesmo número de componentes que o tempo anterior. Portanto, o tempo de 2 horas foi escolhido, já que não existe uma justificativa para um tempo maior. Cabe salientar que volume, comprimento e quantidade de amostra estão inter-relacionados e uma mudança em qualquer uma dessas variáveis afetará as outras.

Equilibração da amostra antes da coleta dos voláteis.

Apenas dois grupos de pesquisadores (3, 40) consideraram a necessidade de uma etapa de equilibração da amostra imediatamente anterior ao processo de captura dos voláteis. Fica evidente na Figura 9 que, nas condições usadas neste trabalho, não há necessidade de um tempo prévio para permitir que a amostra atinja equilíbrio. Os cromatogramas da amostra equilibrada e não equilibrada são idênticos, indicando que o arraste lento dos voláteis por sucção com vácuo muito baixo permite a equilibração dos voláteis durante a coleta, em contraste ao arraste rápido dos voláteis pela passagem de gás.

Desorção normal e reversa

A Figura 10 apresenta os cromatogramas obtidos por desorção normal e reversa. Em geral, as razões quantitativas dos voláteis

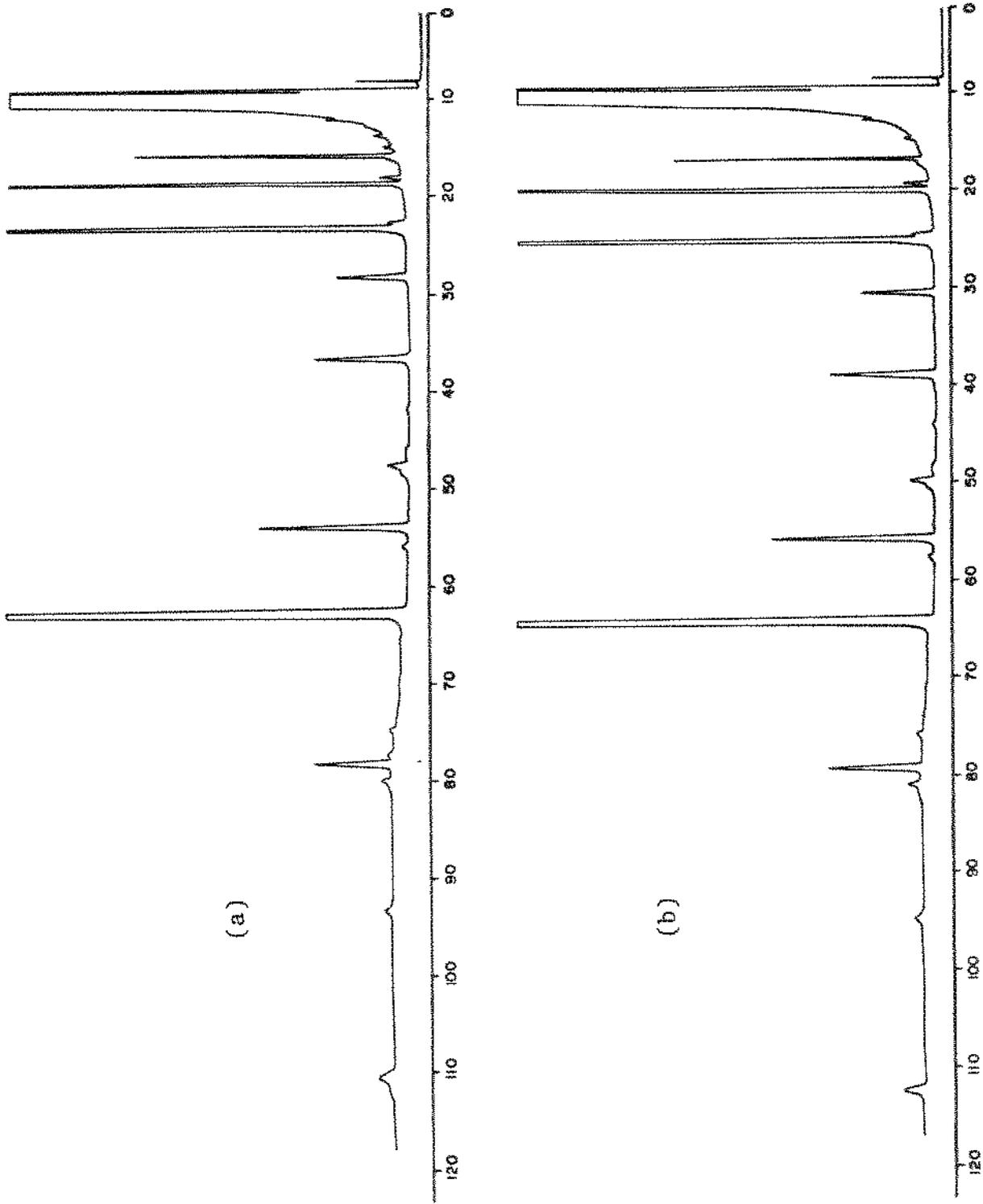


Fig. 9. Cromatogramas ilustrando o efeito de equilíbrio da amostra: (a) amostra equilibrada, (b) amostra não equilibrada.

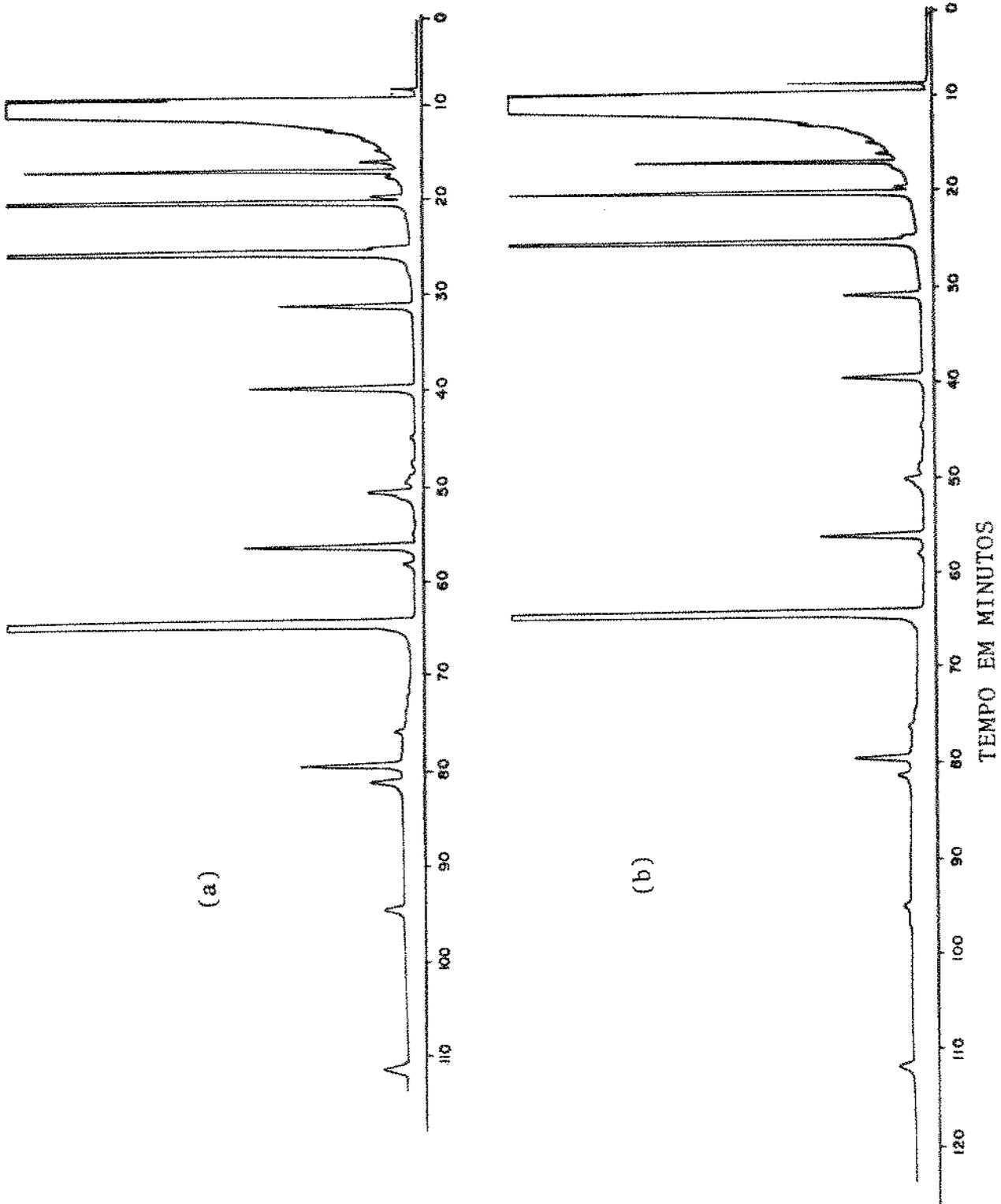


Fig. 10. Cromatogramas ilustrando o efeito da direção de eluição:
(a) desorção reversa, (b) desorção normal.

são semelhantes, indicando que quaisquer das duas maneiras de desorção poderiam ser usadas. Com exceção do pico 1, uma maior concentração dos voláteis foi obtida por desorção reversa. Apesar disso, escolhemos desorção normal, pois além de não perder o pico 1, parece que o cromatograma aproxima-se mais àquele obtido por "direct headspace analysis" (Tabela 3). A concentração ligeiramente maior do pico 20 em relação ao pico 18, invertendo a razão desses picos no cromatograma obtido por "direct headspace sampling" fica mais perceptível na desorção reversa.

Os pesquisadores que empregam polímeros porosos normalmente usam desorção reversa. Wyllie et al. (62) apresentaram evidência que favorece a desorção reversa. Porém eles usaram um sistema-modelo e para separar a influência da etapa da captura dos voláteis, aplicaram a solução diretamente no polímero. No caso da desorção normal o polímero foi imediatamente colocado no sistema de recuperação dos voláteis com aquecimento e fluxo de nitrogênio. Já em desorção reversa, a amostra foi arrastada ao polímero por 5 minutos com nitrogênio e depois a armadilha foi invertida e colocada no sistema de recuperação dos voláteis. Portanto, o tempo de arraste foi muito menor do que seria necessário para amostras reais.

Adição de sal nas amostras frescas

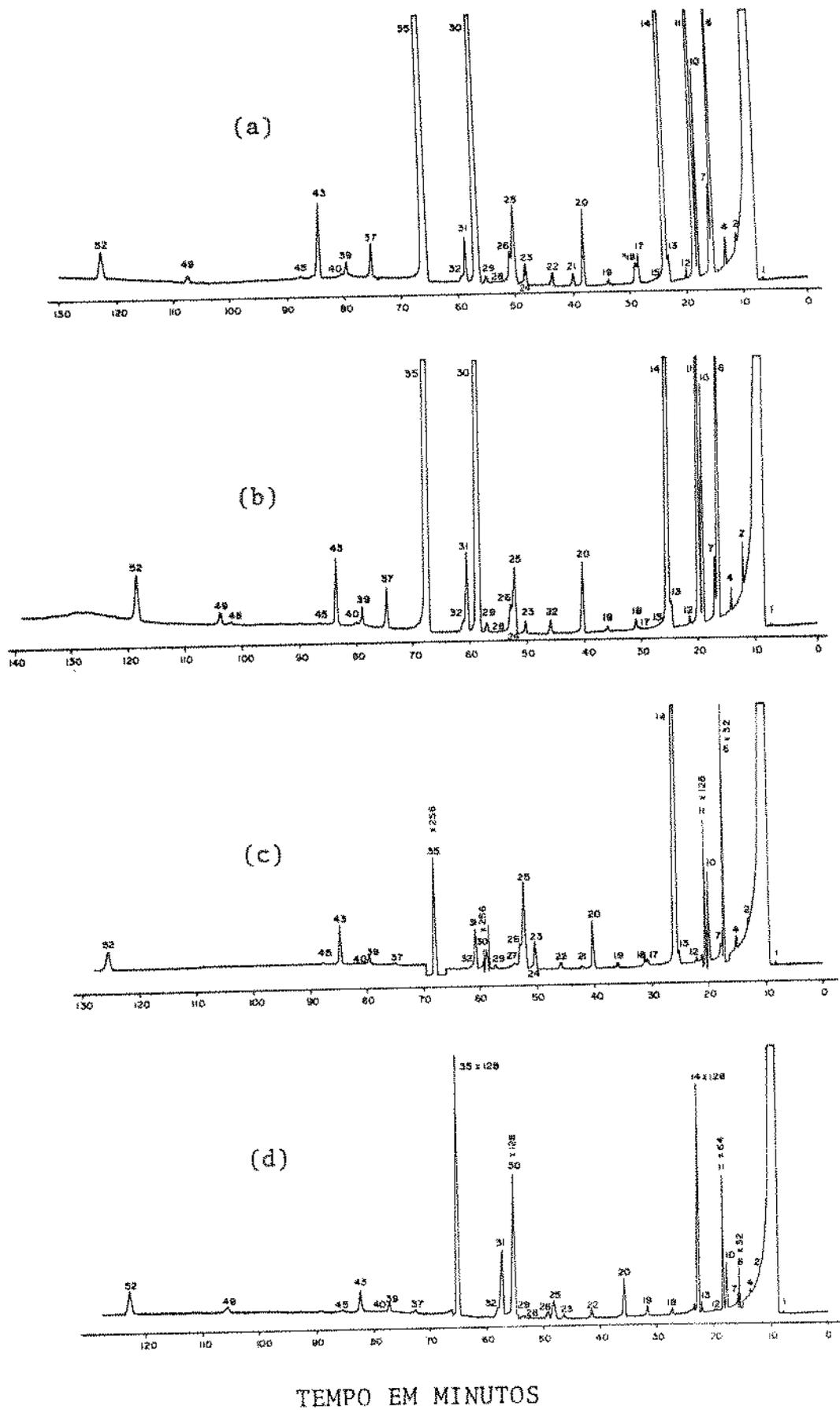
A adição de sal foi recomendada por Murray (38) para prevenir a transformação enzimática dos voláteis durante a preparação da amostra, porém não foi apresentada nenhuma evidência para con

firmar a validade dessa afirmação.

Neste trabalho foram comparados os cromatogramas de amostras de suco natural de graviola com e sem adição de sal (figura 11). Primeiramente foram comparados os cromatogramas da amostra com sal sujeita à coleção imediata dos voláteis, e da amostra sem sal deixada 4 horas em repouso antes da coleta. Verifica-se uma grande modificação na composição dos voláteis da amostra sem sal, pois aumentaram os picos 6, 10, 11, 23, 25 e 26, apareceram os picos 17, 21, 27 e desapareceu o pico 49, aparentemente devido à ação enzimática. Portanto, a adição de sal é indispensável na manutenção da composição original durante o isolamento dos voláteis de frutas frescas.

Quando comparamos os cromatogramas das amostras, sem sal analisada imediatamente e com sal, deixada 4 h em repouso antes da coleta, verificamos que os cromatogramas foram mais semelhantes. O aparecimento dos picos 17 e 21 no cromatograma da amostra sem sal mostra que ocorreu um certo grau de atividade enzimática no intervalo de tempo entre descascamento e introdução dos voláteis no cromatógrafo (2 horas). No cromatograma da amostra com sal deixada em repouso 4 horas antes da coleta, um traço do pico 17 ainda aparece, mostrando que os enzimas podem atuar mesmo na presença de sal, porém em grau muito menor. Portanto, a coleta dos voláteis deve ser feita imediatamente, ainda que sal tenha sido adicionado à amostra.

Fig. 11. Cromatogramas ilustrando o efeito de adição de sal nas amostras frescas: (a) amostra sem sal coletada imediatamente, (b) amostra com sal deixada 4 h antes da coleta, (c) amostra sem sal deixada 4 h antes da coleta, (d) amostra com sal coletada imediatamente.



TEMPO EM MINUTOS

Fig. 11

5.1.2. Reprodutibilidade do método de isolamento

Poucos trabalhos mostram a reprodutibilidade dos métodos para a concentração de voláteis. Noble (40) citou apenas dois trabalhos anteriores ao seu que incluíam uma estimativa da reprodutibilidade (10, 51). Na realidade, três outros trabalhos a incluíram (3, 21, 60), porém apenas sobre alguns componentes principais (5 - 9). Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de 3 tentativas feitas para avaliação da reprodutibilidade do nosso método de isolamento. É evidente que a maioria dos picos tem reprodutibilidade muito alta ($CV \leq 0,1$). As maiores variações ocorrem nos componentes mais voláteis do início do cromatograma. Noble *et al.*, por sua vez, encontraram reprodutibilidade pobre nos picos menores.

Para se ter uma base de comparação, agrupamos os coeficientes de variabilidade em graus de reprodutibilidade de acordo com a classificação de Noble (Tabela 2). Os dados de Noble e Coope, tais como foram encontrados em seu artigo, também foram incluídos nessa tabela.

Deve ser salientado que, além da técnica de aprisionamento, nosso trabalho difere do de Noble *et al.* em três aspectos: (1) a introdução da amostra no cromatógrafo (injeção por seringa & injeção por válvula); (2) o cálculo das áreas dos picos (altura do pico x largura na metade da altura & integração com Autolab Minigrator); e (3) o material analisado (suco de graviola & vinho). O cálculo da reprodutibilidade da técnica de aprisionamen

Tabela 1. Reprodutibilidade do método de captura por sucção em Porapak Q.¹

Picos	Tentativa I			Tentativa II			Tentativa III		
	\bar{A}	s	CV	\bar{A}	s	CV	\bar{A}	s	CV
1							220	198	0,899
2	368	0	0	520	79	0,152	584	260	0,445
3	176	11	0,064	tr.	-	-	tr.	-	-
4	192	0	0	172	51	0,295	164	17	0,103
5	124	5	0,039	156	62	0,398	196	40	0,201
6	804	6	0,007	728	34	0,046	944	68	0,072
7	164	6	0,034	132	40	0,299	138	8	0,061
10	152	0	0	120	23	0,188	96	0	0
11	2488	11	0,004	2688	0	0	2512	204	0,081
13	174	8	0,048	132	34	0,257	102	8	0,083
14	2832	23	0,007	3744	204	0,054	3776	452	0,119
18	81	4	0,052	78	8	0,108	570	8	0,014
20	144	0	0	87	4	0,048	687	38	0,055
25	204	17	0,083	130	14	0,108	150	14	0,094
30	2464	136	0,055	2928	294	0,100	1912	57	0,029
31	100	0	0	80	0	0	27	0	0
33	440	0	0	456	34	0,074	-	-	-
34	80	0	0	80	0	0	-	-	-
35	8384	815	0,097	8352	317	0,037	15168	815	0,053
37	300	85	0,282	192	0	0	64	11	0,176
40	40	0	0	tr.	-	-	tr.	-	-
42	545	7	0,012	368	23	0,061	tr.	-	-
43	170	14	0,083	155	7	0,045	670	156	0,232
45	232	11	0,048	270	14	0,052	tr.	-	-
47	1451	7	0,012	100	0	0	tr.	-	-
52	144	34	0,235	136	11	0,083	192	0	0

As tentativas I e II foram feitas com o suco Marca A e a tentativa III com o suco Marca B. \bar{A} - média das áreas, s - desvio padrão, CV - coeficiente de variabilidade.

Tabela 2. Comparação da reprodutibilidade.

Classe de Reproduti bilidade	Faixa de CV	Porcentagem dos picos em cada categoria					
		Nosso Método			Método de Noble ¹		Método de Coope ²
		I (25) ³	II (23) ³	III (19) ³	A (48) ³	B (48) ³	(47) ³
Muito alta	CV \leq 0,1	92 (23)	65 (15)	63 (12)	25 (12)	21 (10)	13 (6)
alta	0,1 < CV \leq 0,3	8 (2)	30 (7)	26 (5)	45 (22)	37 (18)	19 (9)
média	0,3 < CV \leq 0,5	-	4 (1)	5 (1)	12 (6)	22 (11)	34 (16)
baixa	CV > 0,5	-	-	5 (1)	17 (8)	20 (9)	34 (16)

¹ Noble et al. (40)

² Coope (10)

³ O número em parenteses indica o número de picos em cada categoria.

Os outros picos se encontram como traços.

to em nosso trabalho foi prejudicado pelo uso de seringa e cálculo manual dos picos. Foi por isso que a reprodutibilidade diferiu nas três tentativas. Apesar dessas desvantagens, a reprodutibilidade da nossa técnica ainda é muito alta. A técnica de Noble *et al.* apresentou alta reprodutibilidade, enquanto a de Coope, média e baixa.

5.1.3. Retenção da composição original

Reprodutibilidade apenas não é suficiente, mais importante é a preservação da composição original da amostra. Esse aspecto foi discutido somente em alguns trabalhos e principalmente com sistemas-modelo (3, 27, 62). Os sistemas-modelo não refletem diretamente as condições no alimento, já que é bem conhecido que a composição dos voláteis no "headspace" é dependente não só das concentrações e pressões de vapor dos componentes voláteis, mas também da matriz, isto é, os constituintes não voláteis como proteínas, lipídeos, sal, etc... Nos casos em que amostras reais foram usadas (27, 62) as quantidades relativas, obtidas por "direct headspace sampling" e por aprisionamento em Porapak Q, foram diferentes.

Neste trabalho, além da reprodutibilidade do método, tentamos mostrar a retenção da composição original dos voláteis do "headspace" da amostra (Tabela 3). Isso foi feito comparando-se as proporções quantitativas dos picos principais obtidos por "direct headspace analysis" e a captura por sucção em Porapak Q. Com exceção do pico 18, os outros picos aumentaram proporcionalmente no cromatograma do isolado de Porapak Q, mantendo as razões quantitativas dos picos no cromatograma obtido por "direct

Tabela 3. Quantidades relativas dos voláteis obtidas por "direct headspace" e por captura por sucção em Porapak Q.¹

Nº do pico	"Direct headspace"			Captura em Porapak Q		
	I	II	III	I	II	III
6	tr.	tr.	tr.	1264	1040	1360
11	180	126	138	4448	3200	4160
14	192	150	224	5824	4992	8160
18	48	32	40	1008	960	1008
20	tr.	tr.	tr.	1072	1136	1216
30	144	110	96	2220	2512	2048
35	840	760	780	23360	19712	22272

¹ Para cada tentativa, foram retiradas amostras de uma mesma garrafa para comparação entre "direct headspace" e captura em Porapak Q.

tr - traço.

headspace sampling". A ligeira modificação causada pelo pico 18 é muito menor do que as mudanças produzidas por outros métodos de isolamento.

Uma outra indicação de que não houve acumulação seletiva dos voláteis durante a coleta é o aumento proporcional dos voláteis com o tempo (Figura 8). Componentes preferencialmente concentrados deveriam apresentar, comparativamente, maiores quantidades com o tempo mais curto. Por outro lado, não houve ainda nos períodos de tempo testados, a perda de certos voláteis por passagem pela armadilha.

Aparentemente, a manutenção da composição original dos voláteis do "headspace" no concentrado obtido por nossa técnica de aprisionamento foi possível pelo uso de um vácuo muito baixo e a cuidadosa padronização das condições durante a coleta dos voláteis. Resultados análogos foram obtidos com sistemas envolvendo um gás de arraste. Wyllie *et al.* (62) conseguiram duplicar a razão quantitativa dos voláteis do headspace de um sistema modelo quando a captura em Porapak Q era feita por 60 minutos em um fluxo de nitrogênio de 10 ml/min. Quando o tempo de captura era aumentado até 24 horas, as razões quantitativas foram completamente alteradas devido à passagem dos constituintes mais voláteis através da armadilha. Em um trabalho anterior do mesmo laboratório (27), a essência obtida de Porapak Q, por 15 minutos de captura com um fluxo de nitrogênio de 30 ml/min., não se assemelhava à composição do headspace da solução modelo.

Simpson (46) mostrou que a composição quantitativa dos voláteis

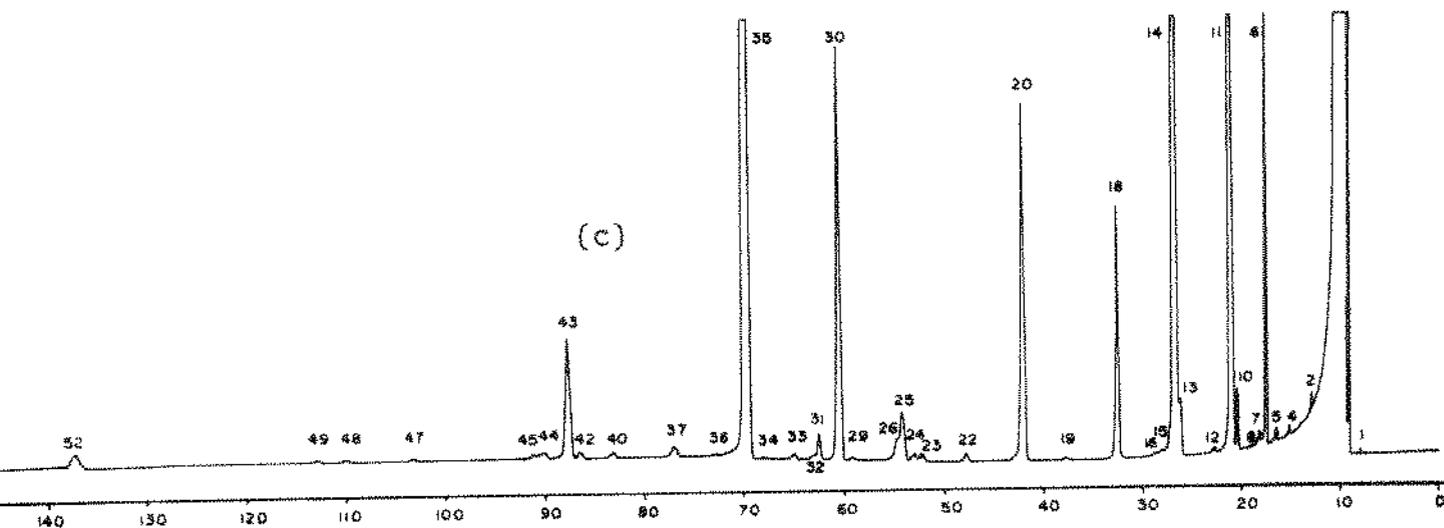
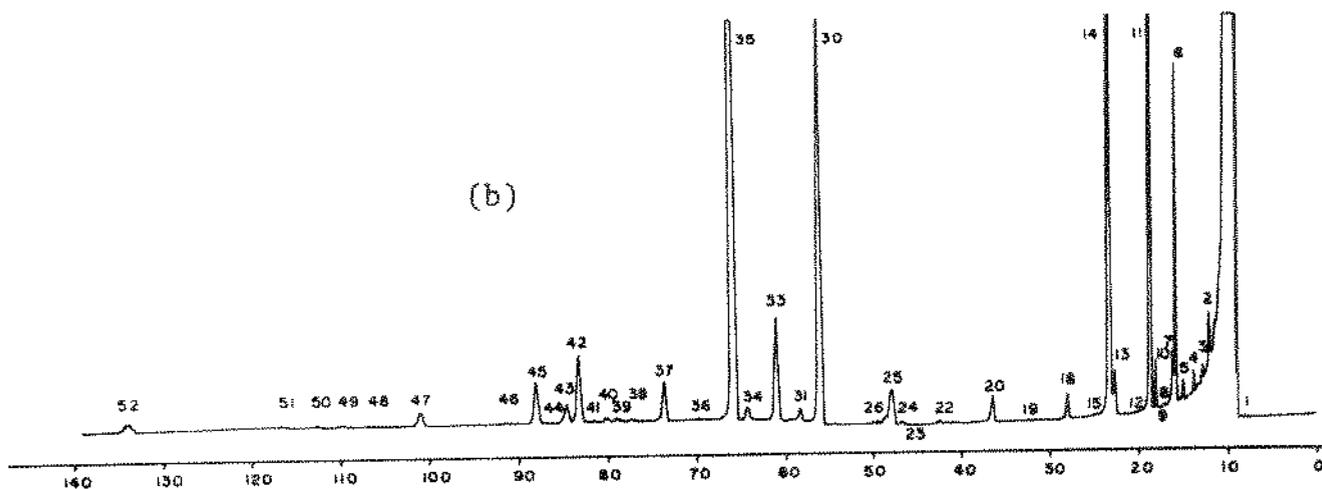
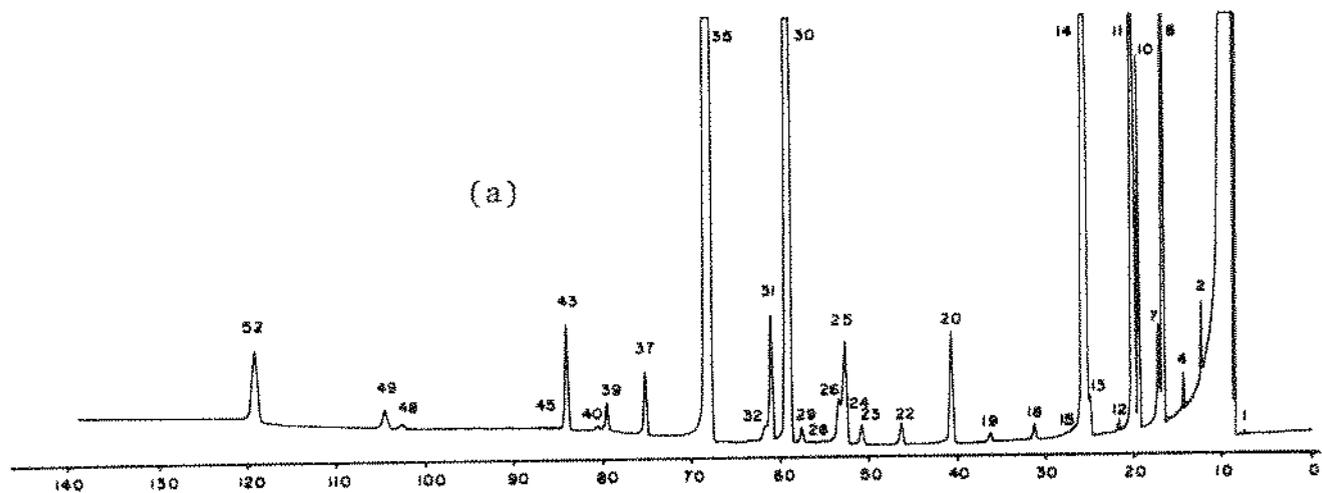
variou com o volume total do gás usado na captura. Observando que a variação com o volume de gás foi quase linear, ele sugeriu a extrapolação das concentrações para um volume zero de nitrogênio para obter as concentrações de equilíbrio.

Jennings e Filsoof (27) salientaram que não existe nenhuma técnica que poderia ser usada satisfatoriamente para vários tipos de amostra. Dependendo do tipo de amostra, porém, poderia ser encontrada uma técnica mais apropriada. O que está parecendo em nosso trabalho é que não é tanto a própria técnica de captura que não permite a obtenção de cromatogramas representativos, mas em muitos casos a escolha imprópria das condições de operação.

5.1.4. Comparação de sucos frescos e processados

A Figura 12 mostra os cromatogramas típicos do suco fresco e dos sucos processados marca A e B e ainda que os picos não tenham sido identificados, várias informações podem ser deduzidas.

Uma comparação dos coeficientes de variabilidade dos sucos frescos e processados (Tabela 4) com os coeficientes de variabilidade apresentado no estudo de reprodutibilidade (Tabela 1) mostra que houve variações entre as amostras do suco fresco e dos sucos processados. Devido à variabilidade inerente das frutas, o suco fresco apresentou as maiores variações. Esta variabilidade diminuiu nos sucos processados devido à homogeneização que ocorre pela mistura de grandes quantidades da fruta. Das duas marcas de suco processado, a marca A apresentou menor variabilidade



TEMPO EM MINUTOS

Fig. 12. Cromatogramas típicos dos voláteis de suco de graviola: (a) suco fresco, (b) suco processado marca A, (c) suco processado marca B.

Tabela 4. Comparação entre a composição dos voláteis do suco fresco e dos sucos processados.¹

Picos	Marca A			Marca B			Suco Fresco		
	\bar{A}	s	CV	\bar{A}	s	CV	\bar{A}	s	CV
1	tr.	-	-				tr.	-	- ²
2	336	214	0,64	334	76	0,23	240	-	-
3	tr.	-	-	tr.	-	-	-	-	-
4	161	25	0,15	164	15	0,09	140	40	0,28
5	110	12	0,11	212	55	0,26	-	-	-
6	795	128	0,16	983	373	0,38	1114	218	0,20
7	157	47	0,30	135	38	0,28	148	28	0,19 ₂
8	tr.	-	-	tr.	-	-	80	-	-
9	tr.	-	-	tr.	-	-	tr.	-	-
10	149	35	0,23	113	41	0,36	307	73	0,24
11	3046	575	0,19	3034	1029	0,34	14016	12860	0,92 ₂
12	tr.	-	-	tr.	-	-	80	-	-
13	169	46	0,27	204	112	0,55	195	101	0,52
14	3287	325	0,10	4924	2187	0,44	21675	10522	0,48
15	tr.	-	-	tr.	-	-	tr.	-	-
16	tr.	-	-	tr.	-	-	tr.	-	-
18	118	52	0,44	864	93	0,11	170	106	0,62
19	tr.	-	-	tr.	-	-	181	121	0,67
20	103	63	0,61	1141	324	0,28	613	297	0,48
22	tr.	-	-	tr.	-	-	170	91	0,53
23	tr.	-	-	tr.	-	-	88	11	0,13
24	tr.	-	-	tr.	-	-	tr.	-	-
25	174	29	0,16	190	101	0,53	613	492	0,80 ₂
26	tr.	-	-	tr.	-	-	100	-	-
28	tr.	-	-	-	-	-	tr.	-	-
29	tr.	-	-	tr.	-	-	73	12	0,16
30	3113	578	0,18	1611	467	0,29	37717	19457	0,51
31	94	11	0,11	82	31	0,38	869	173	0,20
32	tr.	-	-	tr. ₂	-	-	tr.	-	-
33	726	317	0,44	tr. ₂	-	-	-	-	-
34	119	47	0,39	tr. ₂	-	-	-	-	-
35	8842	1304	0,15	14474	2550	0,18	70570	16962	0,24
36	tr.	-	-	tr.	-	-	-	-	-
37	314	120	0,38	74	23	0,31	453	455	1,00
38	tr.	-	-	tr.	-	-	-	-	-
39	tr.	-	-	tr.	-	-	224	85	0,38 ₃
40	36	4	0,12	43	9	0,21	44	6	0,13 ₃
41	tr.	-	-	-	-	-	-	-	-
42	533	129	0,24	tr.	-	-	-	-	-
43	187	32	0,17	692	150	0,22	581	387	0,67
44	tr.	-	-	tr.	-	-	-	-	-
45	345	124	0,36	tr.	-	-	36	6	0,16
46	tr.	-	-	tr.	-	-	tr.	-	-
47	160	54	0,33	tr.	-	-	-	-	- ₂
48	tr.	-	-	tr.	-	-	312	-	-
49	tr.	-	-	tr.	-	-	264	100	0,42
50	tr.	-	-	-	-	-	-	-	-
51	tr.	-	-	-	-	-	-	-	-
52	147	37	0,25	160	51	0,32	935	366	0,39

¹ Foram analisadas 4 amostras do suco marca A, 5 do suco marca B e 3 do suco fresco.

² Detectado em um cromatograma. ³ Detectado em dois cromatogramas.

tr - traço

de, mostrando que a indústria envolvida exerceu um bom controle das etapas de processamento.

Comparando-se as áreas dos picos entre suco fresco e processado, percebe-se uma modificação drástica da composição quantitativa e qualitativa dos componentes voláteis nos produtos processados. Houve uma diminuição marcante da maioria dos picos, demonstrando a grande perda dos voláteis durante o processamento. Entretanto, nenhum componente volátil da fruta desapareceu completamente nos sucos processados.

No suco processado A, o maior decréscimo ocorreu nos picos 10, 11, 14, 19, 20, 22, 25, 30, 31, 35, 39, 43, 48, 49 e 50. Por outro lado, houve um aumento notável no pico 45 e formação de 5 componentes (picos 5, 33, 34, 42 e 47) que não apareceram na fruta, e ainda os picos 41, 50 e 51, que apareceram apenas como traços.

No suco processado B, a diminuição foi maior nos picos 10, 11, 14, 19, 22, 25, 30, 31, 35, 37, 39, 48, 49 e 52. O pico 18 aumentou bastante e os picos 20 e 43 aumentaram ligeiramente. Foram formados também os picos 5 e 42, porém o último apareceu somente em traços. Os picos 33 e 34 também apareceram em traços em um cromatograma. Comparativamente, a marca B assemelhava-se mais ao suco natural, indicando que este suco foi submetido a um tratamento térmico menos rigoroso que o suco processado marca A, apesar de que o controle do processamento foi melhor para o último.

Quando os cromatogramas da Figura 11 são comparados, torna-se óbvio que nenhuma ação enzimática foi responsável pelas diferenças entre os sucos fresco e pasteurizado. Isto indica que as frutas, depois do corte e descascamento, foram sujeitas a branqueamento ou processamento imediato nas plantas de processamento. As diferenças composicionais entre os sucos fresco e processado foram então introduzidas pelo próprio processo de pasteurização.

Deve ser salientado que a inibição da atividade enzimática durante a análise da amostra fresca é uma etapa necessária neste tipo de estudo comparativo. Se ela não fosse feita, poderia ser concluído erroneamente que a ausência dos picos 17, 21 e 27 no suco processado era devido à perda desses picos durante o processamento.

As informações descritas acima demonstram que o método de aprisionamento poderia servir na indústria como um instrumento objetivo para várias finalidades, tais como localizar a etapa do processamento que causa a maior modificação do aroma do produto final, determinar ou comparar os efeitos dos vários métodos de processamento, avaliar produtos existentes e auxiliar o seu melhoramento e padronização em termos de sabor.

5.1.5. Teste de preferência

Os resultados da análise sensorial demonstraram uma preferência significativa a 1% do suco fresco pelos nortistas em relação aos

sucos processados e também uma preferência pelo suco marca B em relação ao suco marca A nesse mesmo nível de significancia. Os resultados dos sulistas diferiram completamente. Eles ainda deram a melhor média ao suco fresco, porém a diferença não foi significativa em relação à marca A, mas significativa a 1% em relação à marca B. Entre os sucos processados, a marca A foi mais preferida do que a marca B a um nível de significancia de 1%.

Esses resultados estão coerentes com os dados instrumentais. O fato dos nortistas conhecerem e apreciarem a fruta justifica a preferência pelo suco fresco, e entre os sucos processados a preferência pela marca B, que apresentou um perfil dos voláteis bem semelhante ao suco fresco. A coerencia entre os resultados da cromatografia gasosa e da análise sensorial não foi demonstrada pelos sulistas, que não conhecem bem a fruta. Eles não conseguiram distinguir entre o suco fresco e o suco marca A, que apresentaram os cromatogramas mais diferentes e ainda preferiram este último ao suco marca B.

Existe muita discussão na literatura quanto à possibilidade de se utilizar cromatografia gasosa para avaliação do sabor em vez de análise sensorial, que sendo uma avaliação subjetiva, está sujeita à muitos fatores decorrentes dos próprios provadores (52, 57). Muitas vezes, porém, foi afirmado que o cromatograma não representa o sabor como ele é percebido pelo consumidor. Entretanto, é muito provável que isto ocorra devido ao fato que, na maioria dos casos, os cromatogramas não são representativos

da composição original da amostra. Nossos resultados indicam que, se o isolamento dos voláteis é feito de tal maneira que preserve as quantidades relativas dos voláteis, a cromatografia gasosa poderia servir como uma avaliação objetiva do sabor.

5.2. Estudo dos Voláteis de Mamão

5.2.1. Comparação da composição dos voláteis em três estados de amadurecimento

A Tabela 5 apresenta a composição de componentes voláteis de ma mão nos estados verde, intermediário e maduro. Esta tabela, jun to com as Figuras 13, 14 e 15 mostram a grande variabilidade dos constituintes voláteis de mamão, ocorrendo até entre frutas de um mesmo estado de amadurecimento. Diferenças pronunciadas podem ser notadas na Figura 15, apesar de que foram incluídos somente os cromatogramas da fruta madura com bom cheiro. Estas variações devem-se até certo ponto à classificação das frutas de acordo com o grau de maciez, em vez da contagem do tempo após florescimento. As frutas verdes e maduras foram classificadas com grande confiabilidade, porém no estado intermediário poderá ocorrer alguma sobreposição com ambos os estados, verde e madu ro. Apesar disso, é evidente que a maior parte da variabilidade observada é inerente ao mamão. Na graviola, para a qual o mesmo critério foi usado (maciez) para indicar o estado maduro da fru ta, as variações foram apenas quantitativas e em grau muito me nor do que ocorreram no mamão.

Tabela 5 - Componentes voláteis de mamão em três estados de amadurecimento.¹

Nº dos picos	Verde		Intermediário		Maduro	
	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média
1	40-160(6)	91	12-192(6)	114	tr-92	43
2	0-tr(1)	-	0-tr(1)	-	0-tr(1)	-
3	0-tr(2)	-	0-tr(5)	-	0-tr(1)	-
4	0-tr(3)	-	0-tr(5)	-	-	-
5	0-tr(4)	-	0-tr(2)	-	0-tr(2)	-
6	0-tr(3)	-	0-tr(2)	-	0-tr(2)	-
7	0-tr(1)	-	0-tr(2)	-	-	-
8	0-tr(1)	-	0-tr(2)	-	0-48(1)	10
9	8960-129024(6)	60693	56-200704(6)	92169	10240-158720(5)	110490
10	16-440(6)	200	136-976(6)	375	56-1256(5)	536
11	0-264(3)	59	0-252(5)	95	32-120(5)	66
12	-	-	0-tr(1)	-	-	-
13	-	-	0-tr(1)	-	0-216(1)	43
14	-	-	0-60(1)	10	-	-
15	-	-	0-228(3)	68	208-924(5)	558
16	-	-	0-64(2)	12	tr-48(5)	25
17	-	-	0-48(3)	15	tr-112(5)	52
18	-	-	0-80(1)	13	-	-
19	-	-	0-tr(1)	-	-	-
20	-	-	0-tr(1)	-	-	-
21	0-tr(1)	-	0-100(5)	67	32-432(5)	180
22	-	-	0-36(1)	6	-	-
23	0-320(5)	104	0-3584(5)	1181	6464-11776(5)	88256
24	-	-	0-tr(1)	-	-	-
25	-	-	0-144(4)	74	120-640(5)	354
26	-	-	0-48(1)	8	-	-
27	-	-	0-tr(2)	-	-	-
28	-	-	0-tr(1)	-	-	-
29	-	-	0-64(2)	12	-	-
30	0-40(1)	7	0-400(2)	77	-	-
31	-	-	0-tr(1)	-	-	-
32	0-220(4)	91	60-520(6)	256	168-680(5)	344
33	0-240(1)	41	tr-504(6)	155	40-380(5)	159
34	-	-	0-tr(1)	-	0-tr(1)	-
35	0-480(4)	119	0-360(5)	241	80-720(5)	256
36	336-10080(6)	3699	144-14304(6)	5939	408-8960(5)	4091
37	-	-	0-tr(1)	-	0-140(3)	60
38	-	-	-	-	0-100(2)	37

¹ Os números em parenteses indicam o número de amostras em que o pico foi detectado. Seis amostras foram analisadas para os estados verde e intermediário, e 5 para o estado maduro.

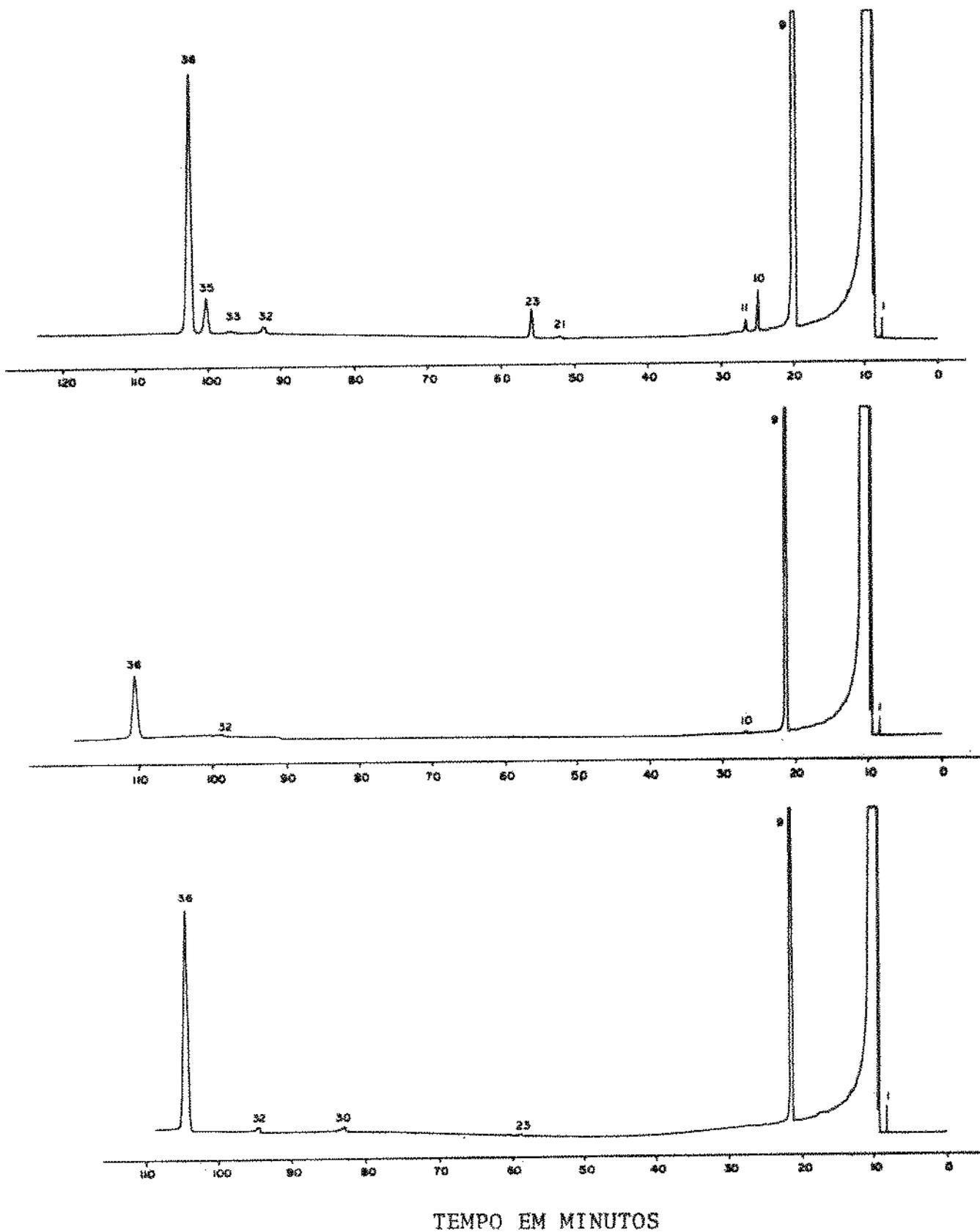


Fig. 13. Cromatogramas dos voláteis de mamão no estado verde.

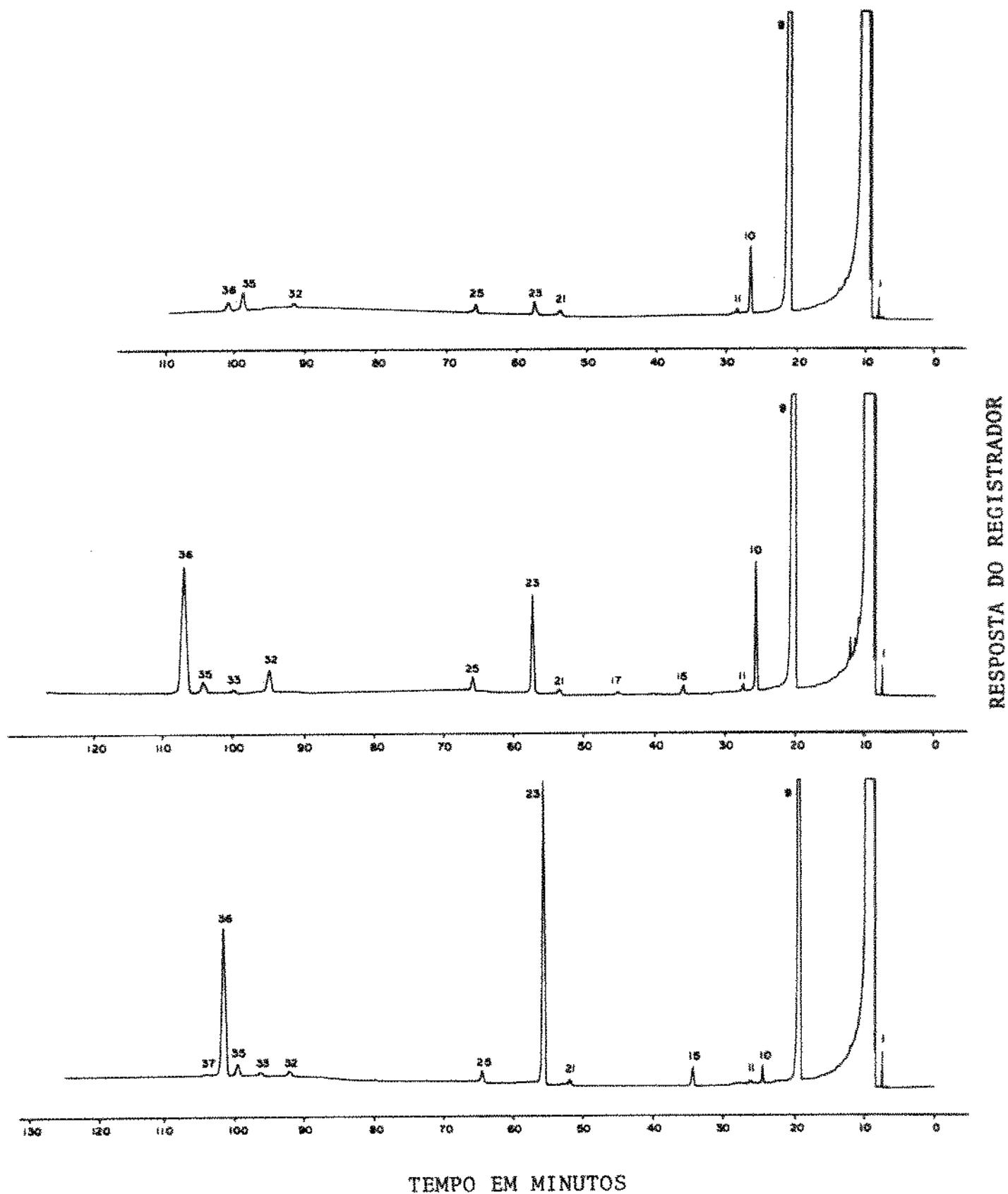


Fig. 14. Cromatograma dos voláteis de mamão no estado intermediário.

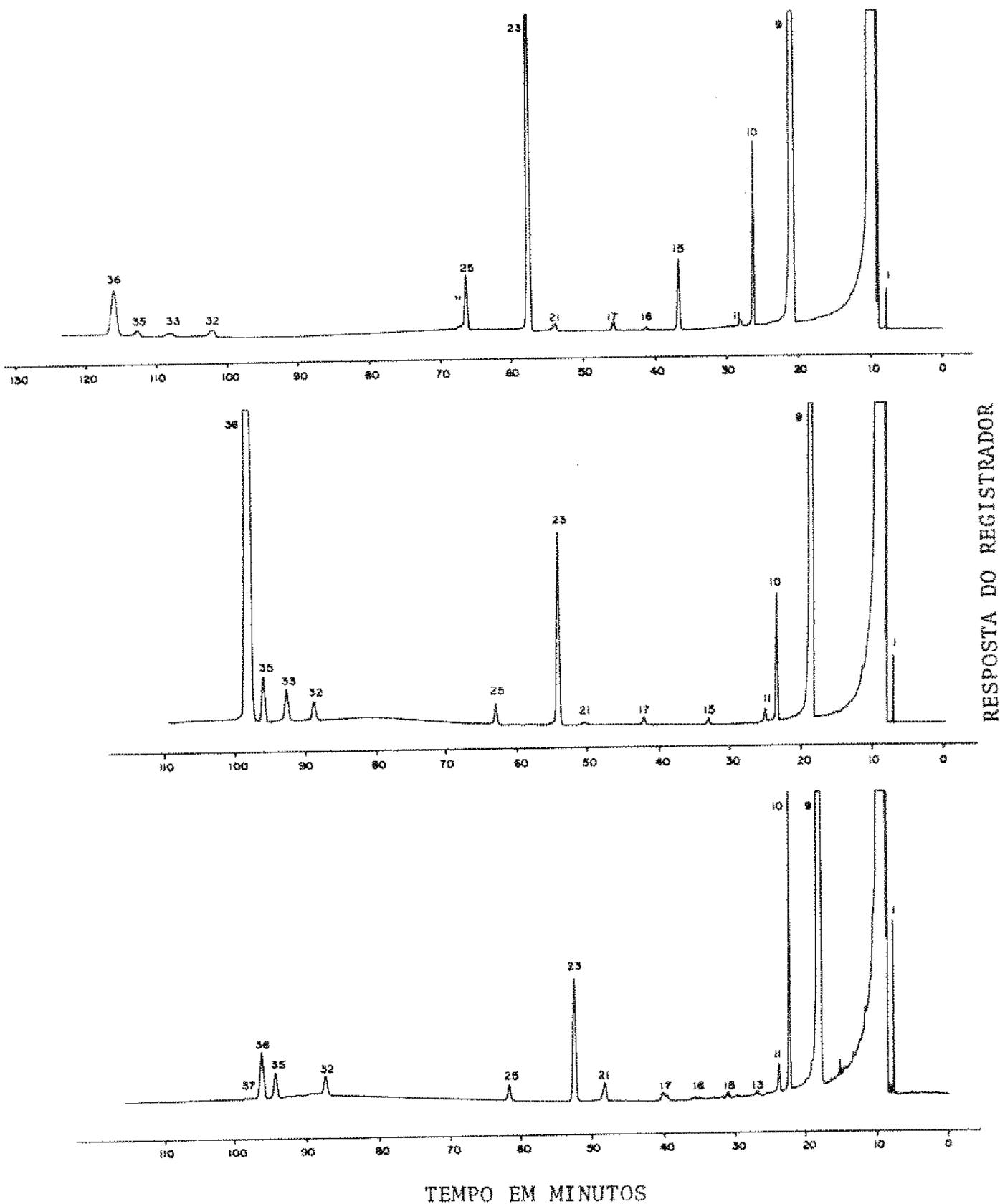


Fig. 15. Cromatogramas dos voláteis de mamão no estado maduro (com bom cheiro).

Apesar destas variações marcantes e o fato de uma análise se quencial da mesma fruta não ter sido possível, algumas tendências definitivas podem ser observadas quanto às mudanças na composição dos voláteis durante o amadurecimento. O número de voláteis, por exemplo, aumentou claramente durante o amadurecimento. No estado verde estavam ausentes os picos 15, 16, 17, 21, 25, 37 e 38. No estado intermediário os cinco primeiros componentes estavam ausentes em alguns cromatogramas, porém no estado maduro eles sempre apareceram, apesar de que os componentes 16 e 17 apareceram somente em traços em dois cromatogramas. Os picos 37 e 38 apareceram somente em três e dois cromatogramas da fruta madura, respectivamente. No estado intermediário, o pico 38 estava ausente e o pico 37 apareceu como traços apenas em um cromatograma.

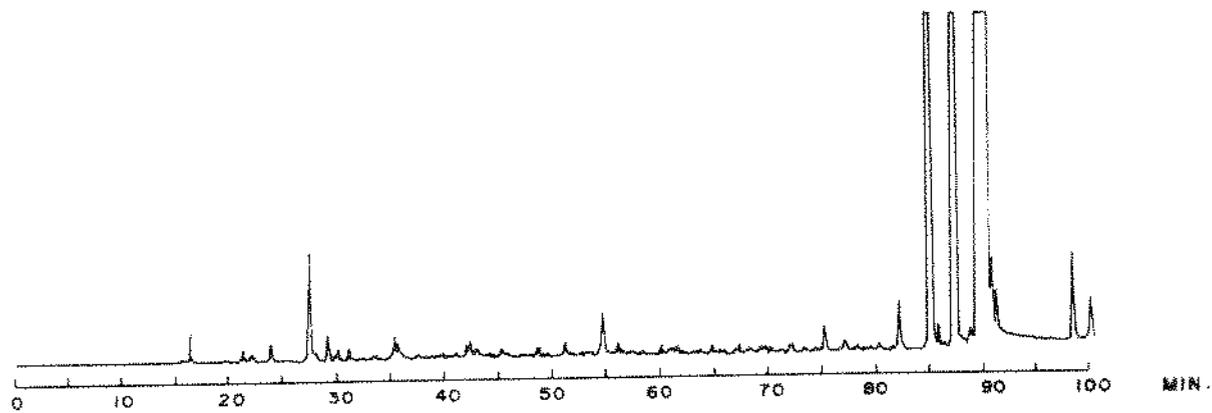
De acordo com as médias (Tabela 5), os voláteis também umentaram quantitativamente durante o amadurecimento. Os picos 11 e 36 são exceções, pois houve um aumento desses componentes no estado intermediário e depois um decréscimo no estado maduro. O pico 23 foi o que mais aumentou até à fruta madura e os picos 32, 33 e 35 aumentaram até o estado intermediário e depois não aumentaram significativamente no estado maduro. Devido às amplas faixas para cada estado (causando a sobreposição do máximo de um estado e o mínimo do estado seguinte) estas mudanças quantitativas dos picos individuais devem ser confirmadas em um estudo sequencial de uma mesma fruta.

A composição dos componentes voláteis de mamão maduro já foi o

objeto de trabalho de Flath e Forrey (17). Partindo de 7,4 kg de fruta, os voláteis foram concentrados por vários tipos de destilação. Foram identificados 106 componentes, dos quais 27 apresentavam-se em quantidades calculáveis e apenas 4 componentes tinham concentrações maiores que 0,5%. Os demais componentes apresentavam-se como traços. Nem todos os componentes identificados são realmente compostos de mamão. Os próprios autores admitem a formação de artefatos e contaminação durante a preparação da amostra para cromatografia gasosa.

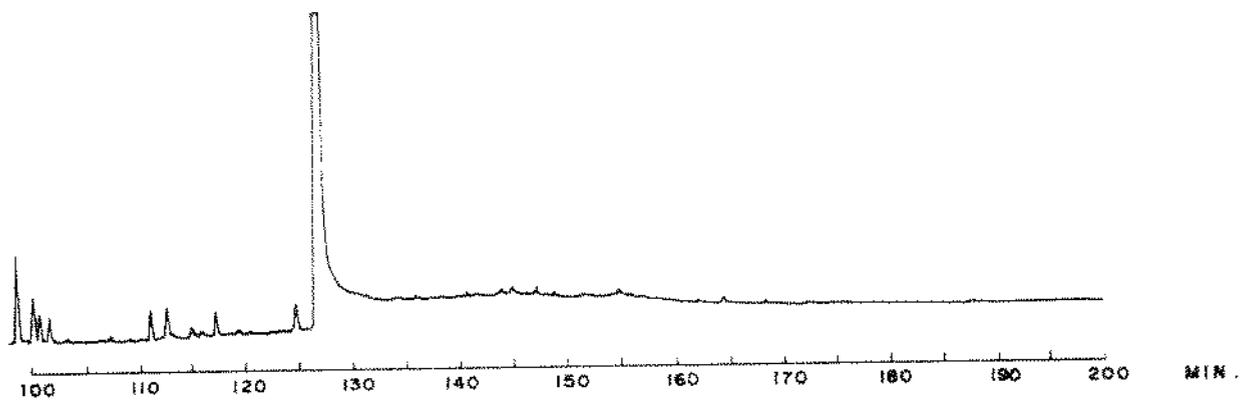
O perfil dos voláteis obtido por Flath e Forrey (Figura 16) difere completamente dos cromatogramas obtidos por nossa técnica de captura em Porapak Q. O pico maior em nosso cromatograma é o 9, seguido pelo 23 e 36. O último, pelas suas características de retenção, deve ser o linalool. No cromatograma de Flath, o maior componente é o linalool, seguido por isotiocianato de benzila e pelos óxidos A e B de linalool. Os autores salientaram que as quantidades relativas dos componentes principais eram dependentes do tratamento recebido pelo tecido da fruta antes e durante a concentração dos voláteis.

Chan et al. (7) compararam os cromatogramas da fruta fresca e purês preparados comercialmente e no seu laboratório usando um método especial. Os voláteis foram isolados por destilação à vácuo, evitando o uso de extração pela coleta de um pequeno volume do destilado em uma armadilha resfriada com nitrogênio líquido. Da fruta fresca foram detectados apenas 6 componentes: acetato de etila, butanol, óxidos A e B de linalool, linalool



TEMPO EM MINUTOS

RESPOSTA DO REGISTRADOR



TEMPO EM MINUTOS

Fig. 16. Cromatograma dos voláteis de mamão, concentrados por destilação à vácuo-extração com éter, obtido por Flath e Forrey (17).

e isotiocianato de benzila. Acetato de etila aparecia como traços no trabalho de Flath e Forrey.

Os cromatogramas obtidos de purê de mamão, principalmente do produto comercial, apresentavam um número muito maior de componentes que a fruta fresca. A quantidade de isotiocianato de benzila aumentava bastante ultrapassando a quantidade de linalool.

5.2.2. Resultados do "sniffing"

Na Tabela 6 encontram-se os resultados da avaliação do aroma dos picos individuais por "sniffing". Apesar de que a equipe não foi treinada e deixada livre para usar suas próprias palavras na descrição do aroma percebido, houve uma coerência na descrição do aroma para vários picos, embora os juízes usassem palavras diferentes. Por exemplo, o pico 11 foi percebido por dois juízes e descrito como remédio e desagradável. A maior concordância entre os quatro juízes ocorreu na descrição do pico 36, percebido por todos eles e descrito como possuindo aroma floral, rosa e jasmim (duas vezes). O componente 9 também foi percebido pelos quatro juízes e descrito como mamão bem maduro e ácido (duas vezes) maracujá ácido e tutti frutti. O componente 23 foi percebido três vezes, com descrições de perfume (duas vezes) e adocicado. Os picos 32 e 33 foram percebidos duas vezes e possuem aroma descrito como doce. Nos componentes 10, 15, 25 e 35 houve uma maior discordância na descrição, mas todos eles foram percebidos e contribuem para o aroma.

Tabela 6 - Avaliação sensorial dos picos individuais por "sniffing".¹

<u>Picos</u>	<u>Descrição do Aroma</u>
9	mamão bem maduro, fortíssimo, meio ácido (2); ácido (1) tutti frutti (1) maracujá,
10	² etéreo (1), doce, caramelo (1)
11	desagradável, (1), remédio (1)
15	doce, açúcar queimado (1), apresenta aroma (1), picante (1)
29	adocicado (1), perfume, forte (2)
25	adocicado (1) fragrante (2) acetona (3) remédio (4)
32	doce, adocicado, caramelo (2)
33	adocicado (2) (lembra mamão)
35	manga verde (1), perfume (1), adocicado, lembra mamão (1)
36	flor (1), rosa (1), jasmim, fortíssimo (2)

¹ Resultados de 4 tentativas com duas frutas (2 tentativas para cada fruta)

Os números em parenteses indicam o número de vezes que o termo foi empregado pelos juízes.

² O pico apareceu muito pequeno em uma das frutas.

Este estudo foi apenas preliminar, mas já deu uma idéia dos componentes que mais contribuem para o aroma, e em alguns casos ainda de que maneira o componente contribui, como nos casos dos picos 36 (floral intenso) 23 (perfume forte) 9 (ácido forte, lembra mamão maduro) 11 (desagradável, fraco) 32 e 33 (doce, fraco).

A importância dada aos picos 9 e 36 pelo estudo de "sniffing" verifica-se nos cromatogramas da Figura 16. Os cromatogramas de mamão com bom cheiro diferem claramente, porém todos eles tiveram quantidades substanciais do pico 9, que parece ser componente de caráter impacto, e do pico 36, que parece ser componente contribuinte dando aroma perfumado. De fato, dois cromatogramas de mamão com bom cheiro, não incluídos na Figura 16, apresentaram quase exclusivamente o pico 9, com os outros componentes ausentes ou somente em traços. Um outro cromatograma, que apresentou quase exclusivamente o pico 36 foi obtido de mamão tendo bom cheiro (perfumado), mas não característico de mamão.

5.3. Limitações do Método de Aprisionamento em Porapak Q

O método de aprisionamento em Porapak Q está ainda limitado sob dois aspectos: 1º) a presença do pico do solvente que oblitera a porção inicial do cromatograma; 2º) a não possibilidade de um estudo sequencial em uma mesma fruta.

O pico largo do solvente pode mascarar picos de componentes voláteis importantes no sabor do produto analisado. No caso de graviola, dois picos aparecem nesta área no cromatograma obtido

por "direct headspace sampling". Nenhum aroma, entretanto, foi percebido quando foi feito um "sniffing" destes picos. Por outro lado, em mamão, um dos três picos obliterados pelo solvente foi apontado como tendo aroma reminescente de mamão. Neste caso, é necessário trocar o processo de desorção ou complementar os cromatogramas obtidos por aprisionamento em Porapak Q com os cromatogramas obtidos por "direct headspace sampling".

A desorção térmica dos voláteis adsorvidos no polímero evita este problema. Porém, surgem outros problemas, devido principalmente à fácil alteração da composição dos voláteis com pequenas flutuações da temperatura de desorção. Apesar de que nossas numerosas tentativas com desorção direta no injetor do cromatógrafo não tiveram sucesso, esta técnica de desorção merece mais investigação. Nesse caso, os voláteis desorvidos diretamente poderiam ser retidos no começo da coluna capilar por resfriamento antes do início do processo cromatográfico.

Para seguir as mudanças durante o amadurecimento, haveria necessidade de análises sequenciais de uma mesma fruta, especialmente no caso de frutas como o mamão, que apresentam grande variabilidade na sua composição de voláteis. No caso de frutas de tamanho pequeno, este problema é facilmente resolvido. As frutas inteiras poderiam ser colocadas dentro do recipiente com tamanho um pouco maior do que o usado neste trabalho.

5.4. Análise do Gás da Cavidade de Mamão e Cupuaçu

Além de ser limitado às frutas com cavidade, Yabumoto et al.(64)

observaram que a análise direta do gás da cavidade era ainda restrita aos componentes de baixo ponto de ebulição, apesar de que o número dos picos detectados era maior do que em "direct head-space analyses", quando ambos os métodos foram aplicados a melão. Apesar destas desvantagens, a simplicidade do método e a possibilidade de estudos sequenciais em uma mesma fruta nos levou a uma tentativa de aplicar o método para seguir as mudanças nos componentes de mamão e cupuaçu durante o amadurecimento.

Com mamão completamente maduro foram obtidos cromatogramas de apenas 3 componentes. Substituindo a coluna capilar por uma coluna empacotada, que permite a introdução de uma amostra com tamanho maior, os cromatogramas apresentaram um número maior de picos (7 picos), mas faltaram resolução e separação. Portanto, uma combinação de análise do gás da cavidade e aprisionamento em Porapak Q foi tentada; o tubo de vidro inserido na cavidade da fruta foi conectado à armadilha de Porapak Q. A fruta, porém, não suportou a sucção.

A análise direta do gás da cavidade também foi tentada em cupuaçu, uma fruta rica em aroma. Ela não apresenta cavidade e foi necessário forçar uma no seu interior. Os cromatogramas obtidos apresentavam um número muito maior de picos do que os de mamão. Foram detectados 16 componentes com coluna capilar. Se os componentes importantes do ponto de vista sensorial estiverem presentes, o método é então suficiente para seguir o amadurecimento da fruta. Com a técnica de captura em Porapak Q foram detectados 50 componentes.

O método de análise do gás da cavidade, portanto, parece mais adequado às frutas ricas em aroma. Porém, com o uso do "gas make up", que aumenta a sensibilidade do detector com colunas capilares, o método também parece promissor para frutas com aroma fraco.

6. CONCLUSÕES

1. A captura de componentes voláteis em uma armadilha de Porapak Q por sucção (vácuo baixo) é aplicável a amostras complexas como voláteis de frutas. O método é altamente reprodutível e não altera a composição original da amostra, desde que sejam cuidadosamente escolhidas as condições de captura.
2. O método é aplicável tanto para frutas com aroma forte como frutas com aroma fraco e pode ser usado amplamente na indústria e na pesquisa.
3. A adição de NaCl inibe transformações enzimáticas dos voláteis durante a preparação de amostras frescas.
4. As mudanças que ocorreram nos sucos processados foram a diminuição da maioria dos picos e a formação de novos componentes. Tais mudanças foram devidas ao próprio processo de pasteurização.
5. É evidente pelos cromatogramas obtidos que o controle das etapas de processamento foi melhor para o suco processado de graviola marca A, porém o tratamento térmico foi menos rigoroso para a marca B.
6. A composição dos componentes voláteis de mamão é grandemen

te variável, mesmo entre frutas de um mesmo estado de amadurecimento. O número e de uma maneira geral, as quantidades dos voláteis aumentaram com o amadurecimento. Os componentes correspondentes aos picos 9 e 36 são importantes para o aroma do mamão.

7. O processo de desorção deve ser mudado quando o pico do solvente obliterar os picos de componentes importantes ao sabor do produto ou os cromatogramas obtidos por aprisionamento terão que ser complementados por cromatogramas obtidos por "direct headspace". O sistema também deverá ser modificado quando estudos sequenciais fôrem necessários.

BIBLIOGRAFIA

1. ALVES, S., JENNINGS, W.G. 1979. Volatile composition of certain amazonian fruits. *Food Chem.* 4:149.
2. BERTSCH, W., ANDERSON, E. e HOLZER, G. 1975. Trace analysis of organic volatiles in water by gas chromatography-mass spectrometry with glass capillary columns. *J. Chromatog.* 112:701.
3. BERTUCCIOLI, M., MONTEDORO, G. 1974. Concentration of the headspace volatiles above wine for direct chromatographic analysis. *J. Sci. Food Agri.* 25:675.
4. BOYKO, A.L., MORGAN, M.E. e LIBBEY, L.M. 1978. Porous polymer trapping for GC/MS analysis of vegetable flavors. Em "Analysis of Foods and Beverages. Headspace Techniques", G. Charalambous, Ed., p.57. Academic Press, Inc., New York.
5. BUTLER, L.D. e BURKE, M.F. 1976. Chromatographic characterization of porous polymer for use as adsorbents in sampling columns. *J. Chromatog. Sci.* 14:117.
6. BUTTERY, R.G., BLACK, D.R., HADDON, W.F., LING, C. e TERANISHI, R. 1979. Identification of additional volatile constituents of carrot roots. *J. Agric. Food Chem.* 27:1.
7. CHAN, H.T. Jr., FLATH, R.A., FORREY, R.R., CAVALETTO, C.G., NAKAYAMA, T.O.M. e BREKKE, J.E. 1973. Development of off-odors and off-flavors in papaya puree. *J. Agric. Food Chem.* 21:566.
8. CHANG, S.S. 1973. Overcoming problems in flavor component identification. *Food Technol.* 27:27.

9. CIOLA, R. 1973. "Introdução à Cromatografia em Fase Gasosa", Editora Edgar, Blücher Ltda., São Paulo.
10. COOPE, G.F. 1977. Masters Thesis, University of California, Davis, C.A., citado em Noble, A.C. Murakami, A.A. e Coope, G.F. 1979. Reproducibility of headspace analysis of wines. J. Agric. Food Chem. 27:450.
11. DRAVINIEKS, A. e O' DONNELL, A. 1971. Principles and some techniques of high-resolution headspace analysis. J. Agric. Food Chem. 19:1049.
12. DUBOIS, P. 1976. Les constituants des aromes des aliments. Ann. Nutr. Alim. 30:341.
13. DUPUY, H.P., BROWN, M.L., LEGENDRE, M.G., WADSWORTH, J.I. e RAYNER, E.T. 1978. Lipids as a source of flavor. Em "Instrumental Analysis of Volatiles in Food Products", ACS Symposium Series, nº 75.
14. DUPUY, H.P., FORE, S.P., GOLDBLATT, L.A. 1973. Direct gas chromatographic examination of volatiles in salad oils and shortenings. J. Am. Oil Chem. Soc. 50:340.
15. EWING, G.W. 1972. Métodos Instrumentais de Análise Química" Vol. 1, p. 379. Editora Edgard Blucher, São Paulo.
16. FLATH, R.A., BLACK, D.R., GUADAGNI, W.H., McFADDEN, W.H. e SCHULTZ, T.H. 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious Apple Essence. J. Agric. Food Chem., 15-29.
17. FLATH, R.A. e FORREY, R.R. 1977. Volatile components of papaya (*Carica papaya* L, Solo Variety) J. Agric. Food Chem. 25:103.

18. FLATH, R.A., FORREY, R.R., TERANISHI, R. 1969. High resolution vapor analysis for fruit variety and fruit product comparisons. *J. Food Sci.* 34:382.
19. FORSS, D.A., DUNSTONE, E.A., RAMSHAW, E.H. e STARK, W. 1962. The flavor of cucumber. *J. Food Sci.* 27:90.
20. FRITZ, J.S. 1977. Concentration of solutes from aqueous solution. *Acc. Chem. Res.* 10:67.
21. GILL, T.A. e NOBLE, A.C. 1974. A rapid and reproducible method for the collection and analysis of headspace volatiles. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.* 7:72.
22. GOLDFARB, D. e BROWN, C.W. 1979. Collection of gas chromatographic fractions on activated charcoal and identification by infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 33:126.
23. HEATHERBELL, D.A., WROLSTAD, R.E. e LIBBEY, L.M. 1971. Isolation, concentration and analysis of carrot volatiles using on-column trapping and gas liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 19:1069.
24. HEIDE, R. ter, VALOIS, P.J. de, VISSER, J., JAEGERS, P.P. e TIMMER, R. 1978. Concentration and identification of trace constituents in alcoholic beverages. Em "Analysis of Foods and Beverages, Headspace Techniques," G. Charalambous, Ed., p. 249, Academic Press, Inc., New York.
25. JENNINGS, W.G. 1977. Volatile components of figs. *Food Chem.* 2:185.
26. JENNINGS, W.G. 1978. "Gas Chromatography with Glass Cappillary Columns", Academic Press, Inc., New York.

27. JENNINGS, W.G. e FILSOOP, M. 1977. Comparison of sample preparation techniques for gas chromatographic analysis. J. Agric. Food Chem. 25:440.
28. JENNINGS, W.G., SEVENANTS, M.R. 1964. Volatile esters of Bartlett pear. J. Food Sci. 29:158.
29. JENNINGS, W.G., WOHLER, R. e LEWIS, M.J. 1972. Gas chromatographic analysis on headspace volatiles of alcoholic beverages. J. Food Sci. 37:69.
30. JENNINGS, W.G., WOHLER, R.H. e LEWIS, M.J. 1974. Isolation of volatile compounds for GLC analysis. MBAA Tech. Quarterly 11:104.
31. KAZENIAC, S.J. e HALL, R.M. 1970. Flavor chemistry of tomato volatiles. J. Food Sci. 35:519.
32. KLIMES, I. e LAMPARSHY, D. 1978. Headspace techniques utilized for the detection of volatile flavor compounds of the vanilla bean. Em "Analysis of Foods and Beverages, Headspace Techniques", Charalambous, G., Ed., p. 95. Academic Press, Inc., New York.
33. KUO, P.P.K., CHLAN, E.S., DSWALLE, F.B. e KIM, J.H. 1977. Gas stripping, sorption and thermal desorption procedures for preconcentration volatile polar water-soluble organics from water samples for analysis by gas chromatography. Anal. Chem. 49:1023.
34. LUND, E.D. e DINSMORE, H.L. 1978. Determination of citrus volatiles by headspace analysis. Em "Analysis of Food and Beverages, Headspace Techniques", Charalambous, G., Ed., p. 135. Academic Press, Inc. New York.
35. MATTEI, A. 1973. Analyse de l'emission volatile de la banane. (Cultivar "Poyo" Groupe Cavendish). Fruits 28:231.

36. MCCARTHY, A.I., PALMER, J.K., SHAW, C.P. e ANDERSON, E.E. 1963. Correlation of gas chromatographic data with flavor profiles of fresh banana fruit. *J. Food Sci.* 28:379.
37. MORGAN, M.E. e DAY, E.A. 1964. Simple on-column trapping procedure for gas chromatographic analysis of flavor volatiles. *J. Dairy Sci.* 47:1382.
38. MURRAY, K.E. 1977. Concentration of headspace, airborne and aqueous volatiles on Chromosorb 105 for examination by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry *J. Chromatog.* 135:49.
39. NICKERSON, G.B. e LIKENS, S.T. 1966. Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *J. Chromatog.* 21:1.
40. NOBLE, A.C., MURAKAMI, A.A. e COOPE, G.F. 1979. Reproducibility of headspace analysis of wines. *J. Agric. Food Chem.* 27:450.
41. NOVOTNY, M., Mc CONNELL, M.L. e LEE, M.L. 1974. Some aspects of high-resolution gas chromatographic analysis of complex volatile samples. *J. Agric. Food Chem.* 22:765.
42. OHLWEILER, OTTO ALCIDES. 1976. *Química Analítica Quantitativa*, vol. 3. Livros Técnicos e Científicos, Ed., p. 1009. Rio de Janeiro.
43. SCHULTZ, T.H., FLATH, R.A., BLACK, D.R., GUADAGNI, D.G., SCHULTZ, W.G. e TERANISHI, R. 1967. Volatiles from Delicious apple-essence extraction methods. *J. Food Sci.* 32:279.
44. SCHULTZ, T.H., FLATH, R.A. e MON, T.R. 1971. Analysis of orange volatiles with vapor sampling. *J. Agric. Food Chem.* 19:1060.

45. SHANKARANAYANA, M.L., ABRAHANS, K.O., RAGHAVAN, B. e NATARAJAN, C.P. 1975. Infrared identification of compounds separated by gas and thin layer chromatography: Applications to flavor analysis. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 6:271.
46. SIMPSON, R.F. 1979. Influence of gas volume sampled on wine headspace analysis using preconcentration on Chromosorb 105. Chromatographia 12:733.
47. SINGLETON, J.A., PATTEE, H.E. 1978. Headspace techniques used in the analysis of volatile components from lipoxygenase catalyzed reactions. Em "Analysis of Food and Beverages. Headspace Techniques", Charalambous, G., Ed., p. 359. Academic Press, Inc. New York.
48. SINGLETON, J.A., PATTEE, H.E. e SANDERS, T.H. 1975. Some parameters affecting volatile production in peanut homogenates. J. Food Sci. 40:386.
49. SIRIKULVADHANA, S., JENNINGS, W.G. e VOGEL, G. 1975. Collection of flower aroma concentrates for gas chromatographic analysis. Flavours. p. 126.
50. TANG, C.S. e JENNINGS, W.G. 1967. Volatile components of apricot. J. Agric. Food Chem. 15:24.
51. TASSAN, C., RUSSEL, G.F. 1974. Sensory and gas chromatographic profiles of coffee beverage headspace volatiles entrained on porous polymer. J. Food Sci. 39:64.
52. TERANISHI, R., ISSENBERG, P., HORNSTIEN, I. e WICK, E.L. 1971. "Flavor Research, Principles and Techniques", Marcel Dekker, Inc., New York.
53. TRESSL, R. e JENNINGS, W.G. 1972. Production of volatile compounds in the ripening banana. J. Agric. Food Chem. 20:189.

54. VITZHUM, O.G. e WERHOFF, P. 1977. Aroma analysis of coffee, tea and cocoa by headspace techniques. 174 American Chemical Society Meeting, Chicago, Illinois August 28-September 2.
55. WELTI, D. L 1972. The examination of gas chromatographic fractions by infrared spectroscopy. Em "Laboratory Methods in Infrared Spectroscopy", R.G.J. Miller and B.C. Stace, Eds., p.186. Heyden & Son Ltd., London.
56. WEURMAN, C. 1969. Isolation and concentration of volatiles in food odor research. J. Agric. Food. Chem. 17:370.
57. WICK, E.L. 1965. Chemical and sensory aspects of the identification of odor constituents in foods. A review. Food Technol. 19:145.
58. WICKREMASINGHE, R.L., WICK, E.L. e YAMANISHI, T. 1973. Gas chromatographic-mass spectrometry analysis of "flavory and non flavory" Ceylon black tea aroma concentrates prepared by two different methods. J. Chromatogr. 79:75.
59. WILLIAMS, A.A., MAY, H.V. e TUCKNOTT, O.G. 1978. Examination of fermented cider volatiles following concentration on the porous polymer Porapak Q. J. Inst. Brew. 84:97.
60. WILLIAMS, P.J. e STRAUSS, C.R. 1977. Apparatus and procedure for reproducible, high-resolution gas chromatographic analysis of alcoholic beverage headspace volatiles. J. Inst. Brew. 83:213.
61. WITHYCOMBE, D.A., MOOKHERJEE, B.D., HRUZA, A. 1978. Isolation of trace volatile constituents of hydrolyzed vegetable protein via porous polymer entrainment. Em "Analysis of Food and Beverages", G. Charalambous, Ed. p.81. Academic Press, Inc., New York.

62. WYLLIE, S.G., ALVES, S., FILSOOP, M. e JENNINGS, W.G. 1978. Headspace sampling: Use and Abuse. Em "Analysis of Food and Beverages, Headspace Techniques", G. Charalambous, Ed., p.1. Academic Press, New York.
63. YABUMOTO, K., JENNINGS, W.G. e YAMAGUCHI, M. 1977. Volatile constituents of Cantaloupe, *Cucumis melo*, and their biogenesis. J. Food Sci. 42:32.
64. YABUMOTO, K., YAMAGUCHI, M., HUGHES, D. e JENNINGS, W.G. 1974. Proc. 1v Int. Congress Food Sci. and Technol. vol. I., p.93.
65. YABUMOTO, K., YAMAGUCHI, M. e JENNINGS, W.G. 1978. Production of volatile compounds by muskmelon, *Cucumis melo*. Food Chem. 3:7.
66. YAMAGUCHI, K. e SHIBAMOTO, T. 1980. Volatile constituents of the Chestnut Flower. J. Agric. Food Chem. 28:82.
67. ZLATKIS, A., BERTSCH, W., LICHTENSTEIN, H.A., TISSHBEE, A., SHUNBO, F., LIEBICH, H.M. COSCIA, A.M. e FLEISCHER, N. 1973. Profile of volatile metabolites in urine by gas chromatographic-mass spectrometry. Anal. Chem. 45:763.