



LIDIANE DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA
UTILIZANDO TÉCNICAS INSTRUMENTAIS E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LIDIANE DE OLIVEIRA

**“ANÁLISE DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM
BARRA UTILIZANDO TÉCNICAS INSTRUMENTAIS E MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS”**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA IZABEL MARETTI SILVEIRA BUENO
CO-ORIENTADOR: DR. ANDRÉ MESSIAS KRELL PEDRO

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA
UNICAMP PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR LIDIANE DE
OLIVEIRA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA IZABEL MARETTI SILVEIRA BUENO

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

OL4a Oliveira, Lidiane de, 1982-
Análise de perda de fragrância em sabonete em barra utilizando técnicas instrumentais e métodos quimiométricos / Lidiane de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Izabel Maretti Silveira Bueno.
Coorientador: André Messias Krell Pedro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fragrâncias. 2. Análise instrumental. 3. Quimiometria. I. Bueno, Maria Izabel Maretti Silveira. II. Pedro, André Messias Krell. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em outro idioma: Analysis of fragrance loss in toilet soap bar using instrumental techniques and chemometrics

Palavras-chave em inglês:

Fragrances

Instrumental analysis

Chemometrics

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Maria Izabel Maretti Silveira Bueno [Orientador]

Fernando Schmidt

Gisele Gonçalves Bortoleto

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Data de defesa: 05-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

*À Deus,
pela minha existência.*

*Aos meus pais, Maria e José,
pelo amor incondicional e por tudo o que me ensinaram.*

*À minha avó Elza,
por ser a minha fortaleza, o meu porto seguro.*

*À minha irmã Alessandra,
por todas as recordações (boas e não tão boas) e risadas.*

*Ao Fernando,
por todo amor e paciência e por ser parte da história da minha vida.*

*À minha querida amiga Analígia (in memoriam),
com muita saudade,
por ter feito (e ser) parte da minha vida e tê-la tornado bem mais colorida!*

“Veganism is in truth an affirmation that where love is, exploitation vanishes. It possesses historical continuity with the movement that set free the human slaves.

Were it put into effect, every basic wrong done to animals by man would automatically disappear. At its heart is the healing power of compassion, the highest expression of love of which man is capable. For it is a giving without hope of a getting.”

(Leslie Cross)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Izabel M. S. Bueno, por ser um ser humano incrível e uma orientadora fantástica... por ter me ensinado muito mais do que química e por ter marcado a minha vida para sempre...

“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas e nos marcam para sempre.” – *Cecília Meireles*

Ao meu co-orientador, Dr. André M. K. Pedro, por todo o apoio, ideias e críticas.

Aos Prof.(s) Dr.(s) Carla B. G. Bottoli, Edvaldo Sabadini, Isabel C. S. F. Jardim e Ivo M. Raimundo Jr., pelas importantes contribuições a esta tese.

À minha querida amiga Juliana Terra, por toda a ajuda (e que ajuda!) e pela grande amizade.

À toda direção e aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, pelo apoio acadêmico e técnico.

“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”
(*Fernando Sabino*)

CURRICULUM VITAE – LIDIANE DE OLIVEIRA

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2007 – 2008 Mestrado em Química – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil.

Título da Dissertação: Potencialidades do uso da espectrometria de raios-X aliada à quimiometria na análise das substâncias restritas pela Diretiva Européia 2002/95/EC – RoHS

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno

2002 – 2006 Bacharelado em Química – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

2013 – atual Gerente Global de Inovação – Oxiteno Brasil Ltda.

2012 – 2013 Coordenadora Sênior de P&D – Symrise Aromas e Fragrâncias Ltda.

2009 – 2012 Coordenadora Global de P&D – Unilever Brasil Ltda.

2000 – 2008 Supervisora da Qualidade – RVD Materiais Dielétricos Ltda.

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

OLIVEIRA, L.; ANTUNES, A. M.; BUENO, M. I. M. S. Direct chromium speciation using X-ray spectrometry and chemometrics. *X-Ray Spectrometry*, 39: 279-284, 2010.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Internacionais: 8

CURRÍCULO LATTES

<http://lattes.cnpq.br/2486136734015291>

RESUMO

ANÁLISE DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA UTILIZANDO TÉCNICAS INSTRUMENTAIS E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS tem por objetivo o desenvolvimento de um método empregando técnicas analíticas instrumentais (Microextração em Fase Sólida por *Headspace* e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (HS-SPME-GC-MS), Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X e Espectroscopia no Infravermelho Próximo) aliadas ao método quimiométrico MASLT (*Multivariate Accelerated Shelf-Life Test*) para análise de perda de fragrância em sabonetes em barra, visando acelerar a obtenção dos dados necessários para a determinação do prazo de validade desse tipo de produto. As amostras analisadas foram sabonetes em barra contendo 1,2% (m/m) de uma fragrância de composição conhecida e os resultados instrumentais foram validados com a avaliação sensorial realizada por um painel treinado, método de análise convencional para esse tipo de estudo. As técnicas de HS-SPME-GC-MS possibilitaram que dados originários de instrumentação analítica fossem utilizados diretamente para o estudo das propriedades de interesse e determinação do prazo de validade do produto, permitindo a realização de estudos mais rápidos e robustos, não baseados apenas em respostas subjetivas oriundas de painéis sensoriais. Além disso, o prazo de validade calculado a partir desses dados concordou com aquele determinado sensorialmente, sendo essa a técnica mais indicada para a aplicação em questão. As outras duas técnicas avaliadas (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X e Espectroscopia no Infravermelho Próximo) se mostraram pouco adequadas para o objetivo proposto, visto que os dados obtidos apresentaram grande interferência de outras variações ocorridas nas amostras (perda de umidade, alterações na apresentação da amostra, mudanças na microestrutura do produto, etc.), não refletindo somente a perda de fragrância.

ABSTRACT

ANALYSIS OF FRAGRANCE LOSS IN TOILET SOAP BAR USING INSTRUMENTAL TECHNIQUES AND CHEMOMETRICS aims at developing a method combining instrumental analytical techniques (Headspace – Solid Phase Micro-Extraction – Gas Chromatography – Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS), X-Ray Spectroscopy and Near Infrared Spectroscopy) and the chemometrics method MASLT (Multivariate Accelerated Shelf-Life Test) for analysis of fragrance loss in toilet soap bar, with the objective of accelerating the data acquisition for determining the shelf-life of this kind of product. The samples consisted of toilet soap bars containing 1.2% (w/w) of a fragrance of well-known composition and instrumental results were validated through sensory analyses performed by a trained panel, standard method for shelf-life studies in case of toilet soap bar. The analytical techniques HS-SPME-GC-MS enabled the direct application of instrumental analytical data for studying the properties of interest and the determination of the shelf-life of the product, allowing faster and more robust studies, not based only on subjective results from sensory panels. Moreover, the shelf-life determined in this case agreed with one determined by the sensory panel, making it the most adequate technique for the application proposed. The other two techniques evaluated were less adequate to the objective proposed, since the data was interfered by other sample modifications (moisture loss, presentation of the sample, microstructure modifications, etc.) and not only by the fragrance loss.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxvii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
I. 1. INTRODUÇÃO	3
I. 2. SABONETES EM BARRA	4
I. 3. FRAGRÂNCIAS	8
I. 4. PRAZO DE VALIDADE	11
I. 4. 1. ESTUDOS DE PRAZO DE VALIDADE E CINÉTICA QUÍMICA	12
I. 4. 2. ESTUDOS DE PRAZO DE VALIDADE ACELERADOS	14
I. 4. 3. ESTUDOS DE PRAZO DE VALIDADE PARA SABONETES EM BARRA	15
I. 5. QUIMIOMETRIA	19
I. 5. 1. ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	19
I. 5. 2. <i>MULTIVARIATE ACCELERATED SHELF-LIFE TEST (MASLT)</i>	21
I. 5. 2. 1. ALGORITMO DO MASLT	23
I. 5. 3. PRÉ PROCESSAMENTO DE DADOS	25
I. 5. 4. PRÉ TRATAMENTO	26
I. 6. MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE FRAGRÂNCIAS	26
I. 6. 1. <i>HEADSPACE</i> ESTÁTICO E DINÂMICO	27
I. 6. 2. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)	28
I. 7. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE FRAGRÂNCIAS	31
I. 7. 1. CROMATOGRAFIA GASOSA E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	31

	Pág.
I. 7. 2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	34
I. 7. 3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO	36
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	39
II. 1. OBJETIVOS	41
CAPÍTULO III – EXPERIMENTAL	43
III. 1. REAGENTES	45
III. 2. MATERIAIS	45
III. 3. EQUIPAMENTOS	45
III. 4. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS E ALGORITMOS	46
III. 5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	47
III. 5. 1. CRIAÇÃO DA FRAGRÂNCIA	47
III. 5. 2. PRODUÇÃO DOS SABONETES EM BARRA	49
III. 5. 3. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)	50
III. 5. 4. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	54
III. 5. 5. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)	55
III. 5. 6. AVALIAÇÕES SENSORIAIS	55
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
IV. 1. OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO POR HS- SPME-GC-MS	59
IV. 1. 1. SELEÇÃO DA FIBRA	59
IV. 1. 2. QUANTIDADE DE AMOSTRA	61
IV. 1. 3. TEMPERATURA DE PRÉ-EQUILÍBRIO E ADSORÇÃO	63
IV. 1. 4. TEMPO DE PRÉ-EQUILÍBRIO	65
IV. 1. 5. TEMPO DE ADSORÇÃO	67
IV. 2. EXCLUSÃO DOS DADOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS ESTOCADAS A 60 °C (HS-SPME-GC-MS)	69

	Pág.
IV. 3. ANÁLISE MULTIVARIADA DA PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA UTILIZANDO HS-SPME-GC-MS	74
IV. 3. 1. RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DA BARRA INTEIRA	88
IV. 3. 2. ANÁLISE UNIVARIADA DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA UTILIZANDO HS-SPME-GC-MS	91
IV. 4. ANÁLISE MULTIVARIADA DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	94
IV. 5. ANÁLISE MULTIVARIADA DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO	100
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO	105
V. 1. CONCLUSÃO	107
CAPÍTULO VI – PERSPECTIVAS	109
VI. 1. PERSPECTIVAS	111
CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
VII. 1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descrição em Inglês	Descrição em Português
AEDA	<i>Aroma Extract Dilution Analysis</i>	---
ANVISA	---	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAR	<i>Carboxen</i>	Carbonexo
CI	<i>Chemical Ionization</i>	Ionização Química
CLAE	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COW	<i>Correlation Optimized Warping</i>	---
DHS	<i>Dynamic Headspace</i>	<i>Headspace</i> dinâmico
DVB	<i>Divinylbenzene</i>	Divinilbenzeno
ECD	<i>Electron Capture Detector</i>	Detector por Captura de Elétron
EDXRF	<i>Energy Dispersive X-Ray Fluorescence</i>	Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia
EI	<i>Electron Ionization</i>	Ionização por Impacto de Elétrons
F	<i>Factor</i>	Fator
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>	Detector por Ionização em Chama
GC	<i>Gas Chromatography</i>	Cromatografia Gasosa
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Abreviatura	Descrição em Inglês	Descrição em Português
GC-O-MS	<i>Gas Chromatography-Olfatometry-Mass Spectrometry</i>	Cromatografia Gasosa-Olfatometria acoplada à Espectrometria de Massas
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HS-SPME	<i>Headspace – Solid-Phase Microextraction</i>	Microextração em Fase Sólida por <i>Headspace</i>
HS-SPME-GC-MS	<i>Headspace – Solid-Phase Microextraction – Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>	Microextração em Fase Sólida por <i>Headspace</i> e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
IFRA	<i>International Fragrance Association</i>	Associação Internacional de Fragrância
INMETRO	---	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
KI	<i>Kovats Index</i>	Índice de Kovats
LTMGC	<i>Low Thermal Mass Gas Chromatography</i>	---
MASLT	<i>Multivariate Accelerated Shelf-Life Test</i>	---
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	Espectrometria de Massas
NCI	<i>Negative Chemical Ionization</i>	Ionização Química Negativa
NIR	<i>Near Infrared Spectroscopy</i>	Espectroscopia no Infravermelho Próximo

Abreviatura	Descrição em Inglês	Descrição em Português
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	Ressonância Magnética Nuclear
OSC	<i>Orthogonal Signal Correction</i>	Correção Ortogonal de Sinal
PC	<i>Principal Component</i>	Componente Principal
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>	Análise por Componentes Principais
PCI	<i>Positive Chemical Ionization</i>	Ionização Química Positiva
PDMS	<i>Polydimethylsiloxane</i>	Polidimetilsiloxano
PEG	<i>Polyethylene Glycol</i>	Polietilenoglicol
SCCNFP	<i>Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products</i>	Comitê Científico para Produtos Cosméticos e Não Alimentares
SDE	<i>Simultaneous Distillation-Extraction</i>	Destilação-Extração Simultânea
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i>	Extração com Fluido Supercrítico
SHS	<i>Static Headspace</i>	<i>Headspace</i> Estático
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>	Extração em Fase Sólida
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i>	Microextração em Fase Sólida
USE	<i>Ultrasonic Solvent Extraction</i>	Extração Ultrassônica com Solvente

LISTA DE TABELAS

Tabela	Descrição	Pág.
1	Composição da fragrância utilizada.	48
2	Escala utilizada na avaliação sensorial.	56
3	Ajuste dos <i>scores</i> para PC1 (HS-SPME-GC-MS).	80
4	Comparação entre perda de água (em massa) no interior (meio) e na superfície da barra (sup.).	83
5	Comparação entre a velocidade (k) calculada para perda de fragrância no interior e na superfície da barra (HS-SPME-GC-MS).	84
6	Cálculo do prazo de validade para 27 °C usando os dados obtidos a 37 e 45 °C (HS-SPME-GC-MS).	85
7	Cálculo do prazo de validade para sabonetes em barra disponíveis no mercado.	87
8	Comparação entre a velocidade (k) calculada para perda de fragrância a partir da análise da barra inteira e de pastilha (HS-SPME-GC-MS).	90
9	Cálculo do prazo de validade para 27 °C usando os dados obtidos a 37 e 45 °C (HS-SPME-GC-MS, barra inteira).	91
10	Parâmetros calculados para perda de fragrância em sabonetes em barra através de análise univariada (HS-SPME-GC-MS).	93
11	Ajuste dos <i>scores</i> para PC2 (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).	98

Tabela	Descrição	Pág.
12	Cálculo do prazo de validade para 27 °C usando os dados obtidos a 37 e 45 °C (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).	99
13	Ajuste dos <i>scores</i> para PC1 (Espectroscopia no Infravermelho Próximo).	102
14	Cálculo do prazo de validade para 27 °C usando os dados obtidos a 37 e 45 °C (Espectroscopia no Infravermelho Próximo).	103

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Pág.
1	Representação esquemática do processo moderno de produção de sabonetes.	07
2	Exemplos de compostos químicos usados como fragrância.	09
3	Representação do MASLT.	22
4	Procedimento de desdobraimento do arranjo de dados X nas condições de estocagem.	25
5	Preparação das amostras de sabonete para análise por HS-SPME-GC-MS.	50
6	Jarro de vidro utilizado para a análise da barra inteira.	51
7	Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para as três fibras testadas: PDMS; PDMS / DVB; DVB / CAR / PDMS.	60
8	Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para as três fibras testadas: PDMS; PDMS / DVB; DVB / CAR / PDMS.	60
9	Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para as quatro massas testadas: 200, 300, 400 e 500 mg.	62
10	Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para as diferentes massas testadas: 200, 300, 400 e 500 mg.	62
11	Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para as temperaturas testadas (35, 45 e 55 °C).	64
12	Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para as temperaturas testadas (35, 45 e 55 °C).	64
13	Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para os diferentes tempos de pré-equilíbrio testados (0, 10, 20 e 40 minutos).	66

Figura	Descrição	Pág.
14	Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para os diferentes tempos de pré-equilíbrio testados (0, 10, 20 e 40 minutos).	66
15	Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para os diferentes tempos de adsorção testados (5, 10, 20 e 40 minutos).	68
16	Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para os diferentes tempos de adsorção testados (5, 10, 20 e 40 minutos).	68
17	Relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura, através da lei de Arrhenius (HS-SPME-GC-MS) – incluindo os dados de 60 °C.	70
18	Cromatogramas (HS-SPME-GC-MS) obtidos para as amostras de sabonetes em barra estocadas por 87 dias a a) 45 °C e b) a 60 °C. Condições cromatográficas: coluna do tipo HP-5MS (5% fenil metil siloxano) 30 m x 0,25 mm x 0,2 µm, temperatura inicial do forno 40 °C, mantida por 2 minutos, seguida de aquecimento de 2 °C / minuto até 140 °C e 5 °C / minuto até a temperatura final de 250 °C, mantida por 2 minutos. As temperaturas do injetor, auxiliar e detector foram mantidas a 270 °C, 280 °C e 230 °C, respectivamente. O injetor foi operado no modo splitless. Hélio, grau de pureza 99,9%, fornecido pela Linde Gases Ltda., foi utilizado como gás de arraste com vazão de 0,8 mL/min. O detector de espectrometria de massas foi programado para varrer a faixa de massas de 50 a 550 m/z, utilizando uma fonte de íons de 70 eV. Solvent delay de 0,2 minutos foi utilizado em todas as corridas.	71

Figura	Descrição	Pág.
19	Cromatogramas (HS-SPME-GC-MS) obtidos para as amostras de sabonetes em barra estocadas por a) 13 dias a 60 °C e b) 59 dias a 27 °C. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18.	73
20	Cromatograma típico (HS-SPME-GC-MS) obtido para amostra de sabonete em barra. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18.	75
21	Cromatograma típico (injeção líquida, GC-MS) obtido para amostra da fragrância pura. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18.	75
22	a) Segmento dos cromatogramas originais obtidos para amostra de sabonete em barra; b) Mesmo segmento após correção com o algoritmo COW. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18.	76
23	Gráfico dos scores para a) PC1 e b) PC2 (HS-SPME-GC-MS).	78
24	Cromatograma típico (HS-SPME-GC-MS) obtido para amostra de sabonete em barra. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18. Repetição da Figura 20.	79
25	<i>Loadings</i> para PC1 (HS-SPME-GC-MS).	79
26	Ajuste dos <i>scores</i> para PC1 (HS-SPME-GC-MS).	80
27	Relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura, através da lei de Arrhenius (HS-SPME-GC-MS).	81
28	Cromatograma típico (HS-SPME-GC-MS) obtido para as pastilhas. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18. Repetição da Figura 20.	89
29	Cromatograma típico (HS-SPME-GC-MS) obtido para análise da barra inteira. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18.	89

Figura	Descrição	Pág.
30	Espectro típico obtido por Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X para uma amostra de sabonete em barra.	95
31	<i>Scores</i> para PC1 (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).	96
32	Ajuste dos <i>scores</i> para PC2 (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).	96
33	<i>Loadings</i> para PC1 e PC2 (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).	97
34	Relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura, através da lei de Arrhenius (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).	99
35	Espectro típico no Infravermelho Próximo obtido para amostra de sabonete em barra.	101
36	<i>Scores</i> para PC1 (Espectroscopia no Infravermelho Próximo).	102
37	Relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura, através da lei de Arrhenius (Espectroscopia no Infravermelho Próximo).	103

I – INTRODUÇÃO

“Tú te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”
(A. S. Exupéry)

I. 1. INTRODUÇÃO

O mercado de cosméticos, higiene e cuidado pessoal possui grande relevância para o cenário econômico mundial, apresentando um crescimento de 17,7% entre 2009 e 2012 e tendo como foco principal o desenvolvimento de novos produtos, com cada vez mais valor agregado. Trata-se de um mercado que movimentou 433 bilhões de dólares em 2012, com destaque para a categoria de banho, que apresenta grande penetração no mercado mundial, com vendas anuais de 38 bilhões de dólares em 2012 e um crescimento acumulado de 15,9% entre 2009 e 2012 [1].

O Brasil é o líder da categoria de banho na América Latina, com vendas de aproximadamente 3 bilhões de dólares em 2012. Apesar do constante crescimento em vendas dos sabonetes líquidos, principalmente devido a maior conveniência de uso e massivos investimentos em propaganda por parte das empresas líderes desse mercado (Unilever e Colgate-Palmolive), os sabonetes em barra ainda são consumidos em maior volume, representando 79% do total de vendas da categoria em 2011, 65% dos lançamentos em 2012 e sendo responsável por mais de 60% de toda fragrância consumida no caso da categoria de banho [1].

Cerca de 99,4% dos lares brasileiros usam sabonetes, sendo esse um dos produtos de cuidado pessoal com maior penetração no mercado nacional. Buscando aumentar ainda mais esse mercado, as empresas necessitam inovar e adicionar valor aos produtos, uma vez que o aumento de penetração possível é quase insignificante (cerca de 0,6%) [1].

No caso de agregar mais valor ao produto, existem dois atributos que atuam como principais direcionadores de consumo para sabonetes: fragrância e espuma [1].

Pesquisas de mercado mostram que cerca de 1/3 (36%) dos consumidores americanos, por exemplo, escolhem o seu produto pela fragrância, sendo que esse número aumenta para 43% entre as mulheres [1].

De fato, fragrância é um recurso extremamente importante para as empresas de cosméticos, higiene e cuidado pessoal. A função primária da fragrância nesse mercado é mascarar o odor das diferentes bases ou de ingredientes ativos, mas ela também tem um papel fundamental para o *marketing* do produto, permitindo sua diferenciação ou de sua marca em relação aos seus concorrentes. Além disso, as fragrâncias podem ajudar na entrega de aspectos funcionais do produto, sendo relacionadas às funções específicas (revitalização, proteção, cuidado, etc.) ou sendo usadas para provocar respostas emocionais singulares em consumidores [1].

I. 2. SABONETES EM BARRA

Desde o seu surgimento, os sabonetes¹ sempre tiveram a função de proteger nossa saúde e a das crianças. A saúde está diretamente relacionada à limpeza e, no caso das crianças, dados mostram que quanto maior o consumo de sabonete em um dado país, menor a taxa de mortalidade infantil. Em países industrializados, o sabonete é o produto de higiene e cuidado pessoal mais disponível e usado diariamente. Em alguns países em desenvolvimento, por outro lado, esse produto ainda permanece caro e escasso [2].

A referência literária mais antiga ao sabão está relacionada à lavagem de lã e foi encontrada em pedaços de madeira pertencentes aos sumérios e datados de aproximadamente 2500 anos a.C.. O conceito de limpeza possui origens

¹ O termo sabonete refere-se a uma composição contendo sabão, fragrância e outras matérias primas, enquanto o termo sabão refere-se somente ao produto de reação entre uma solução alcalina e óleos e gorduras.

INTRODUÇÃO

religiosas, mas nem sempre foi relacionado a algo positivo. Por séculos, os banhos tinham usos estritamente ritualísticos e sagrados, e não relacionados à limpeza. Os gregos foram os primeiros a considerar o banho por razões estéticas e o faziam em casas de banho públicas, enquanto os romanos, que também possuíam essas casas, estimulavam a limpeza [2].

Não há dados que provem com exatidão quando o primeiro sabão foi descoberto. De acordo com uma lenda romana, o sabão teria sido descoberto próximo ao Monte Sapo, local onde os antigos romanos faziam sacrifícios de animais. Quando chovia, a gordura animal resultante dos sacrifícios se misturava com as cinzas de madeiras, escorria pelas montanhas e atingia o rio Tibre, onde as mulheres romanas lavavam suas roupas. Elas então perceberam que quando usavam essa espécie de barro, as roupas ficavam muito mais limpas, com menos esforço. Outra teoria afirma que o sabão foi descoberto pelo povo de Gália, em uma tentativa de extrair óleo a partir do sebo [2].

Acredita-se que os fenícios foram os primeiros a desenvolver a fabricação de sabão, que foi levada para a Inglaterra pelos celtas, em 1000 d.C. e, a partir de então, disseminada por toda Europa. A produção em maior escala ocorreu na Inglaterra a partir do século XIV, mas a relutância em usar o produto para lavar o corpo manteve-se até o século XVI. Após, o sabão continuou a ser algo raro, uma vez que seu alto custo permitia que apenas a elite o utilizasse, assim como o banho em si. No século XVIII, dois químicos franceses criaram as condições para a produção industrial de sabão, como hoje se conhece: Nicholas Leblanc desenvolveu o processo de obtenção de soda cáustica a partir do cloreto de sódio e Michel Eugene Chevreul descobriu a química dos óleos e gorduras. As marcas comerciais de sabonetes mais antigas e existentes até hoje datam exatamente do final do século XVIII (Yardley (1770) e Pears (1789)), enquanto algumas das maiores companhias do setor surgiram no século XIX (Colgate-Palmolive (1806), Procter & Gamble (1837) e Unilever (1884)). Com o passar dos anos, as

INTRODUÇÃO

formulações foram ficando mais complexas, incorporando um número crescente de aditivos, e os sabonetes, que tradicionalmente tinham o objetivo de limpar a pele, tornaram-se sistemas carregadores baratos e convenientes para entrega de fragrância [2].

Sabão, comumente definido como um sal de ácido graxo, é o produto da reação entre uma solução aquosa de hidróxido de sódio (ou hidróxido de potássio) com óleos e gorduras de fontes naturais (animais ou vegetais). Os ácidos graxos mais comumente utilizados são oriundos de sebo, óleo de coco e óleo de palma e a distribuição das cadeias alifáticas varia de acordo com a fonte de material graxo utilizada, incluindo cadeias de C8 a C22, bem como cadeias insaturadas, entre elas a oleica (C18:1), a linoleica (C18:2) e a linolênica (C18:3) [2].

Assim como uma molécula de surfactante, o sabão contém uma cabeça hidrofílica (um grupo carboxilato) e uma cauda hidrofóbica (a cadeia alifática), permitindo que o produto dissolva fases aquosas e orgânicas, forme uma monocamada na interface ar-líquido (relacionada com a formação e estabilidade da espuma), além da capacidade de limpeza [2].

Uma fórmula padrão de sabonete, por sua vez, contém sabão de sódio (de 75 a 85%), água (aproximadamente 15%), fragrância e agentes quelantes. Pigmentos ou branqueadores (dióxido de titânio, por exemplo) também são utilizados [2].

No Brasil, assim como em muitos outros países (Argentina, África do Sul, etc.), a principal fonte de óleos e gorduras utilizada para a produção do sabão de sódio é o sebo animal, especialmente o bovino. O sebo é um subproduto da indústria pecuária, geralmente produzido por grandes frigoríficos, e sua aplicação em sabonetes em barra é resultado da sua grande disponibilidade e menor custo quando comparado à outras fontes de material graxo, como, por exemplo, óleo de palma. Mesmo passando por diversas etapas de purificação durante seu processamento, incluindo o branqueamento e a desodorização, parte do forte odor

característico do sebo permanece no material, impactando negativamente o odor final do sabão base. Como consequência, quando o sabão base é produzido a partir dessa fonte de gordura, a fragrância deve ser capaz de perfumar o produto e encobrir o odor desagradável do sebo, assegurando que o consumidor não o perceba [2].

A produção atual de sabonetes em barra contempla um moderno processo industrial (Figura 1) que inclui as seguintes etapas:

- 1- Saponificação: reação entre óleos e gorduras e hidróxido de sódio para produção do sabão base (*noodles*);
- 2- Mexedeira: mistura da massa base (*noodles*) e demais matérias primas;
- 3- Cilindros: homogeneização em um grau superior ao proporcionado pela mexedeira;
- 4- Extrusora: produção de uma massa totalmente homogênea e uniforme;
- 5- Prensa: prensagem da massa para obtenção do sabonete em barra;
- 6- Empacotadeira: embalagem em envoltórios ou caixinhas de papelão [2].

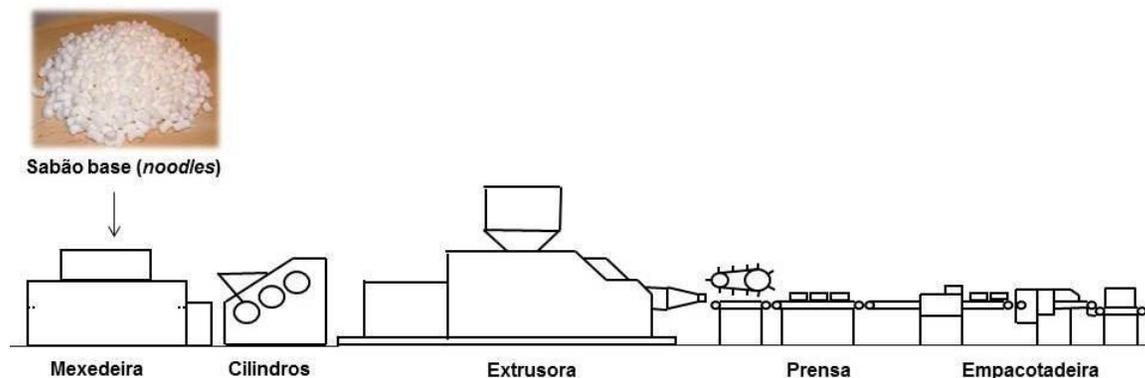


Figura 1 – Representação esquemática do processo moderno de produção de sabonetes.

I. 3. FRAGRÂNCIAS

A história do desenvolvimento de fragrâncias, ou perfumes, data do início da história da humanidade. Nas civilizações primitivas, os homens costumavam queimar vários tipos de madeira para manterem-se aquecidos e iluminados, e descobriram, acidentalmente, que a fumaça tinha um cheiro agradável quando madeiras e ervas perfumadas eram usadas para a queima. Eles também descobriram que ao adicionar madeiras resinosas em água, essa tornava-se oleosa e odorífera, e essa mistura podia ser aplicada sobre a pele, deixando-a cheirosa e protegida. Vestígios de perfumes foram encontrados nas tumbas dos faraós egípcios e papiros da época contêm registros de fórmulas em que elementos botânicos, minerais e animais eram empregados como agentes odoríferos. Os antigos gregos e romanos aprenderam com os egípcios a arte da perfumaria, que por muitos séculos permaneceu como algo exclusivamente oriental. Os perfumes atingiram o ocidente somente no início do século XIII, durante as Cruzadas. No século XVI, a arte da perfumaria foi levada para a França através de René, de Florença, Itália, perfumista de Catherine de Medicis (esposa do rei Henrique II). Desde então vários séculos se passaram, mas a França e a Itália permanecem como centros mundiais de produção e comércio de perfumes [3].

A palavra francesa *parfum* deriva do prefixo latim *per*, que significa através, e do substantivo *fumus*, que quer dizer fumaça, e era, no passado, usada como uma designação internacional para qualquer odor agradável derivado de uma fonte natural animal ou vegetal. Atualmente, essa palavra é usada não somente para definir os odores agradáveis provenientes de fragrâncias naturais, como também daquelas de origem sintética [3].

Para que um composto possua cheiro ou odor, duas condições necessitam ser satisfeitas: (i) o composto deve ser volátil, de forma a ser transportado até os receptores presentes na membrana nasal; (ii) sua

INTRODUÇÃO

concentração deve ser alta o suficiente para ser percebida (a concentração mínima perceptível varia de acordo com o composto e de pessoa para pessoa) [3].

O odor, a volatilidade e a estabilidade dos materiais usados em perfumaria são determinados pelas suas estruturas químicas. Quase todos os materiais usados são compostos orgânicos, normalmente contendo oxigênio, algumas vezes nitrogênio e raras vezes enxofre ou cloro. Entre os grupos funcionais mais usados como fragrâncias encontram-se os hidrocarbonetos terpênicos, os álcoois, os aldeídos, as cetonas, as lactonas, os ácidos carboxílicos e os ésteres. Alguns exemplos desses compostos são apresentados na Figura 2 [3].

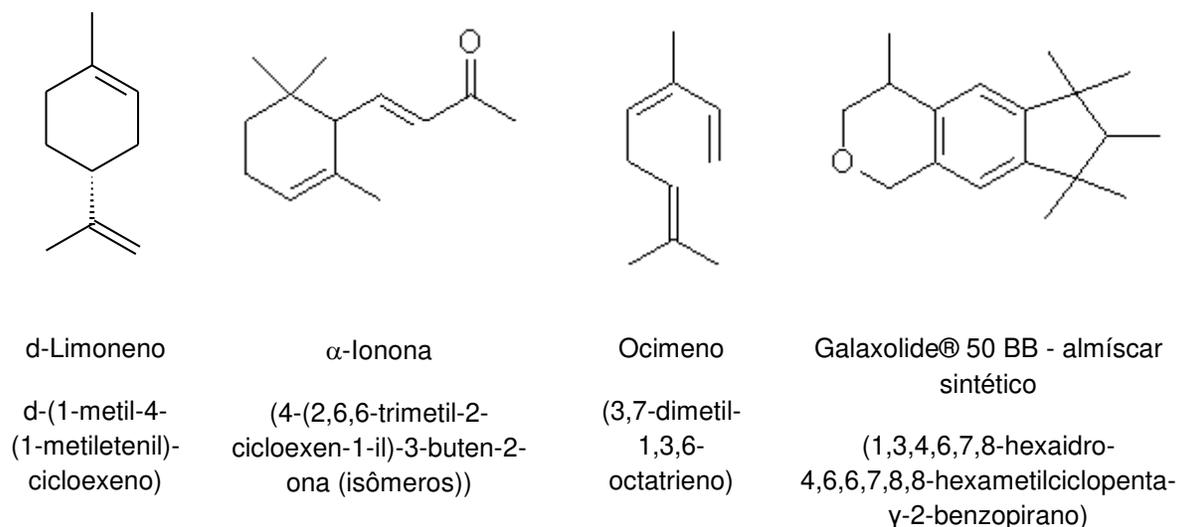


Figura 2 – Exemplos de compostos químicos usados como fragrâncias.

As fragrâncias são tradicionalmente classificadas quanto à sua origem. As naturais (aproximadamente quinhentas) são aquelas extraídas de fontes encontradas na natureza, através da aplicação de processos físicos de separação, tais como destilação e extração com solvente. Essas são usadas há milhares de anos como matéria prima para perfumaria e suas fontes podem ser plantas, flores,

frutas, sementes, madeiras, raízes, resinas vegetais, etc. Alguns animais, como o cervo-almiscareiro, também eram usados há séculos como fontes de fragrâncias naturais, mas seu uso vem sendo banido por organizações protetoras dos animais, visto que o animal precisa ser morto para extração da substância de interesse [3, 4]. As fragrâncias sinteticamente produzidas são muitas (cerca de três mil) e foram introduzidas a partir de 1837, com a obtenção de benzaldeído a partir do tolueno [4, 5]. Muitas delas – vanilina e rosas, por exemplo – foram primeiramente descobertas na natureza e depois sintetizadas. Outras são frutos da criatividade de químicos e nunca foram obtidas a partir de fontes naturais. Outras ainda foram sintetizadas para substituir um produto natural que fora proibido, como no caso dos almíscares [3 – 6].

Durante toda a história das fragrâncias, o desenvolvimento de técnicas analíticas para sua análise e caracterização sempre foi alvo de interesse de pesquisadores e da indústria. A indústria de perfumes representa um negócio bilionário, que movimentou cerca de 20 bilhões de dólares em 2012, com mais de 50% desse mercado dominado pelas quatro maiores casas de fragrâncias (Givaudan, Firmenich, IFF e Symrise), sendo a IFRA (*International Fragrance Association*) o organismo de regulamentação oficial no mundo todo [7].

O desenvolvimento e aplicação de metodologias para a determinação da composição química de fragrâncias é algo bastante desafiador e requer técnicas modernas de amostragem e preparação da amostra, separação do analito, detecção e quantificação. Os principais desafios nessa área são: a) as concentrações dos analitos de interesse são extremamente baixas (algumas vezes abaixo de 1 ng/L), requerendo procedimentos analíticos altamente sensíveis, com limites de detecção e quantificação adequados para essas espécies; b) a maioria das fragrâncias é uma mistura complexa, podendo conter centenas de diferentes compostos orgânicos voláteis; c) fragrâncias geradas por fontes naturais são sistemas dinâmicos, que variam de acordo com diversos

fatores (local de extração, luz, umidade, etc.); d) algumas fragrâncias, terpenos, por exemplo, possuem limitada estabilidade química, sofrendo reações de degradação quando expostas à luz, oxigênio, etc. [8].

As técnicas de separação, ou extração, mais utilizadas para fragrâncias são: hidrodestilação, destilação a vapor, destilação a vácuo, destilação fracionada, destilação-extração simultânea (SDE - *Simultaneous Distillation-Extraction*) ou método Lickens-Nickerson, prensagem a frio, extração com solvente, extração Soxhlet, extração com fluido supercrítico (SFE - *Supercritical Fluid Extraction*), microextração em fase sólida (SPME - *Solid Phase Microextraction*), extração com solvente orgânico e irradiação ultrassônica (USE - *Ultrasonic Solvent Extraction*), e *headspace* estático (SHS - *Static Headspace*) ou dinâmico (DSH - *Dynamic Headspace*) [8 – 38].

Para a análise das fragrâncias, a cromatografia gasosa, acoplada ou não a espectrometria de massas, é a técnica analítica mais empregada [8 – 38]. Narizes eletrônicos também vêm sendo desenvolvidos [34 – 38].

I. 4. PRAZO DE VALIDADE

A legislação brasileira, por meio da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), estabelece que todos os produtos industrializados, entre eles alimentos, medicamentos, produtos de higiene pessoal, cosméticos, etc., devem informar o respectivo prazo de validade em suas embalagens. O prazo de validade é definido, pela própria agência, como “tempo em que o produto mantém suas propriedades, quando conservado na embalagem original e sem avarias, em condições adequadas de armazenamento e utilização” [39].

Apesar de na maioria dos casos não definir o método ou protocolo que deverá ser utilizado para determinação do prazo de validade dos produtos, a ANVISA classifica os dados de estabilidade como “registros técnicos específicos”

e exige que as metodologias e conclusões que garantam o prazo de validade declarado estejam na empresa à disposição da autoridade competente para fins de auditoria [39]. Assim, a análise do prazo de validade pode ser definida como um protocolo de pesquisa que tem por objetivo reunir evidências de que o produto de fato atende às especificações legais e de mercado até o momento de seu uso pelos consumidores [40] e os parâmetros e seus limites aceitáveis, bem como as condições desse protocolo são definidos pelos pesquisadores de cada empresa, de acordo com o produto e especificidades do mercado, visto que consumidores atribuem valores distintos a diferentes parâmetros de qualidade.

I. 4. 1. ESTUDOS DE PRAZO DE VALIDADE E CINÉTICA QUÍMICA

Cinética (palavra derivada do grego *kinesis*: movimento, mudança, mutação) é o ramo da ciência que se dedica a estudar a velocidade em que as reações envolvidas nos processos químicos ocorrem e os fatores que as influenciam (pressão, temperatura, presença de catalisador, etc.), provendo informações sobre os mecanismos das reações e estados de transição [41].

As teorias e conceitos envolvidos nesse ramo da ciência não serão detalhadamente descritos na introdução desse trabalho e informações a respeito podem ser encontradas em HOUSE [41].

Em resumo, a velocidade de uma reação química genérica do tipo:



segue a seguinte relação:

$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{c} \frac{d[C]}{dt} = \frac{1}{d} \frac{d[D]}{dt} = \dots \quad (\text{Equação 2})$$

onde v é a velocidade da reação e $d[X]/dt$ é a taxa de variação da concentração molar de uma dada espécie X com relação ao tempo [40 – 43].

A equação integrada da velocidade dessa reação é então escrita como:

$$v = k[A]^m[B]^n \dots \quad (\text{Equação 3})$$

INTRODUÇÃO

onde k é a constante de velocidade (que independe das concentrações de quaisquer das espécies) e m e n são as ordens de reação com relação às espécies A e B , respectivamente [40 – 43].

No caso do prazo de validade de bens de consumo, entretanto, o estudo de velocidade normalmente não é feito com base na variação da concentração molar de uma dada espécie química, mas sim na variação de uma ou algumas propriedades de interesse com relação ao tempo de vida do produto. Em geral, a natureza complexa de produtos de higiene e limpeza, cosméticos e fármacos, que podem possuir dezenas de ingredientes em sua formulação, e de produtos alimentícios, que usualmente apresentam interações entre centenas de compostos diferentes, torna impraticável a definição do prazo de validade através da determinação direta de concentrações das espécies químicas envolvidas [40].

Nesse caso, aplicando-se duas aproximações (de que a concentração molar da uma espécie química pode ser substituída pelo valor medido de uma dada propriedade P e de que a variação dessa propriedade é independente das demais) a equação integrada da velocidade pode ser reescrita como:

$$v = \frac{dP}{dt} = kP^n \quad (\text{Equação 4})$$

onde P é a propriedade de interesse, k a constante de velocidade e n é a ordem global para o processo de degradação [40 – 43].

A degradação da maioria das propriedades de interesse em bens de consumo segue cinética de ordem pseudo-zero, pseudo-um ou pseudo-dois, e, por isso, a integração da Equação 4 gera as seguintes soluções:

$$P - P_0 = kt \quad \text{para cinética de ordem pseudo-zero} \quad (\text{Equação 5})$$

$$\ln\left(\frac{P_t}{P_0}\right) = kt \quad \text{para cinética de ordem pseudo-um} \quad (\text{Equação 6})$$

$$\frac{1}{P_t} - \frac{1}{P_0} = kt \quad \text{para cinética de ordem pseudo-dois} \quad (\text{Equação 7})$$

onde P_t é o valor da propriedade de interesse² P no tempo t e P_0 é o valor dela no tempo zero [40 – 43].

Através da aplicação desses conceitos e da definição dos limites aceitáveis³, ou pontos de corte, para uma dada propriedade P é possível, então, calcular o tempo envolvido na variação dessa propriedade de P_0 a P_t , a uma determinada temperatura, sendo esse tempo correspondente ao prazo de validade do respectivo produto para aquela condição.

I. 4. 2. ESTUDOS DE PRAZO DE VALIDADE ACELERADOS

Considerando a teoria acima apresentada, a determinação do prazo de validade de um produto requereria que o estudo fosse conduzido até que um parâmetro atingisse um nível inaceitável de qualidade (ponto de corte) quando estocado em temperatura ambiente. Apesar deste fato não ser restritivo para produtos de prazo de validade curto, ele inviabilizaria a condução de um estudo completo para bens de consumo de longa validade e, por isso, a condução de estudos acelerados de prazo de validade é prática comum na indústria de bens de consumo [40].

Estudos de prazo de validade acelerados consistem em submeter o produto de interesse a condições mais severas de estocagem (temperaturas elevadas, ciclos de temperatura, variação da umidade relativa do ambiente, fontes de radiação, etc.), com o objetivo de que a variação da(s) propriedade(s) de interesse ocorra de maneira mais rápida (ou acelerada) do que à temperatura ambiente [40].

² A propriedade de interesse P não precisa ser necessariamente um dado instrumental. Dados oriundos de painéis sensoriais podem ser aplicados para esse fim. A única restrição existente é que os dados sejam numéricos e contínuos, independente de sua origem.

³ Limite de uma dada propriedade P , quando essa deixa de atender aos limites definidos pelas legislações aplicáveis e/ou pelo mercado.

Uma das formas mais frequentes de acelerar esses estudos é submeter o produto a estocagem em altas temperaturas, visto que k é dependente da temperatura e a maioria das reações que ocorrem em bens de consumo seguem a lei de Arrhenius (Equação 8), ou seja, quanto maior a temperatura maior a velocidade da reação:

$$k_T = Ae^{-Ea/RT} \quad (\text{Equação 8})$$

onde k_T é constante de velocidade da reação para uma dada temperatura T , o parâmetro A é chamado de fator pré exponencial ou fator de frequência, Ea é a energia de ativação da reação em estudo e R é a constante dos gases [40 – 43].

Os resultados obtidos à altas temperaturas são calculados e então extrapolados para a temperatura ambiente, permitindo a conclusão desses estudos em prazos consideravelmente menores.

I. 4. 3. ESTUDOS DE PRAZO DE VALIDADE PARA SABONETES EM BARRA

No caso de sabonetes em barra, são quatro as propriedades (P) de interesse controladas durante estudos de prazo de validade: teor de umidade, cor, característica (hedônico) e intensidade de fragrância.

O teor de umidade é controlado para atender questões legais, uma vez que a perda de umidade ao longo do prazo de validade afetará o peso da barra de sabonete e, no Brasil, há um limite máximo para essa variação estabelecido pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) [44]. Essa propriedade é controlada por medidas instrumentais e, geralmente, analisada por titulação Karl Fischer ou análise gravimétrica (teor de voláteis). Alterações no teor de umidade ocorrem devido a processos físicos de evaporação [2].

O controle de cor da barra é realizado para atender uma especificação de mercado, visto que alterações nessa propriedade são facilmente percebidas pelos

consumidores. O valor dessa propriedade é medido visualmente, através do uso de um painel treinado, e/ou por meio de medidas instrumentais obtidas com o uso de um espectrofotômetro. Alterações na cor da barra são, na maioria das vezes, originadas a partir de processos químicos de oxidação e hidrólise de componentes de fragrância e/ou de sabões insaturados [2].

A fragrância, como já mencionado anteriormente, é um dos dois principais direcionadores de consumo no caso de sabonetes e, por isso, a monitoração de propriedades ligadas a ela ao longo do prazo de validade faz-se extremamente necessário e visa atender às expectativas do consumidor, isto é, entrega de fragrância intensa e sem alteração de caráter e intensidade ao longo de todo o prazo de validade.

As alterações de caráter e intensidade de fragrância são, no geral, resultados de processos físicos de difusão e volatilização, mas também podem envolver reações químicas de oxidação e hidrólise, entre outras. Esses processos ocorrem em velocidades distintas para cada componente da fragrância (em função dos diferentes valores de ponto de ebulição e pressão de vapor), gerando um processo multivariado. Apesar da criticidade envolvida nesse processo, as avaliações de fragrância em sabonete em barra são realizadas por técnicas sensoriais, devido à dificuldade técnica envolvida na extração da fragrância para análise.

As técnicas sensoriais podem ser divididas em análise discriminativa ou descritiva. As análises discriminativas determinam se duas ou mais amostras são diferentes, ou seja, se existem diferenças percebidas entre elas, e são aplicadas em amostras que têm suas formulações alteradas ou que foram produzidas a partir de processos diferentes, sendo realizadas por painéis de consumidores ou por uma equipe de pessoas treinadas para essa avaliação (painel treinado). As análises descritivas, por sua vez, são utilizadas na avaliação de atributos de um produto específico, podem ser qualitativas (descrevem as características do

produto avaliado) ou quantitativas (graduam atributos específicos) e são realizadas por um painel de pessoas treinadas [45].

No caso de avaliação de fragrância em sabonetes em barra para estudos de prazo de validade, a técnica sensorial utilizada é a análise descritiva, realizada por um painel treinado (usualmente 6 a 12 indivíduos) e baseada em escalas previamente definidas. Geralmente, as amostras são analisadas com relação a caráter e intensidade e as avaliações são feitas às cegas. A avaliação cega significa aquela realizada pelo painel na ausência de qualquer expectativa⁴, ou seja, quando o produto é avaliado fora de sua embalagem e codificado com números. Além disso, a avaliação pode ser monádica (uma amostra por vez) ou comparativa, quando diferentes amostras são comparadas entre elas ou comparadas com uma amostra padrão utilizada como referência (geralmente, amostras estocadas a baixas temperaturas (onde as reações de envelhecimento/degradação estariam virtualmente paradas), com o objetivo de simular um produto recém produzido).

Para realização dos estudos, amostras de sabonete em barra são produzidas e maceradas⁵ por 15 dias. Após esse período, as barras são embaladas na embalagem final de mercado e estocadas em diferentes condições de temperatura, geralmente por um período de 90 dias. Todas as amostras utilizadas para um dado estudo devem ser iguais (mesmo lote, mesmo processo, etc.).

As condições de estudo podem variar de acordo com o protocolo de prazo de validade definido por cada empresa, mas usualmente são elas:

⁴ A expectativa representa o quanto o painelista espera gostar ou não do produto sem de fato o ter avaliado, mas apenas observado a sua embalagem.

⁵ Após sua produção, as barras de sabonetes são mantidas em repouso por um período de 15 dias, chamado de maceração. Esse período é indicado pelas casas de fragrância e tem por objetivo garantir melhor interação entre a base do sabonete e a fragrância.

- temperaturas de 5 à 10 (geladeira), 27 (ambiente), 37 e 45 °C – algumas vezes, temperaturas ainda mais altas também são utilizadas (50 ou 60 °C);
- avaliação das amostras no tempo zero e após 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de estocagem.

Os resultados obtidos são analisados e, geralmente, considera-se que 90 dias a 45 °C corresponde a 24 meses a temperatura ambiente, ou seja, uma amostra aprovada ao final do estudo a 45 °C poderá ser comercializada com um prazo de validade de 24 meses.

Os principais problemas ou desafios envolvidos nos estudos de prazo de validade para sabonetes são:

- apesar da correlação citada acima (90 dias a 45 °C corresponde a 24 meses a temperatura ambiente) ser considerada como uma regra na indústria de sabonetes, ela não possui qualquer validação científica;
- a correlação acima considera que o comportamento de todas as fragrâncias e de todas as diferentes formulações de sabonetes é sempre o mesmo, o que não é correto;
- mesmo sendo o procedimento padrão para esse tipo de avaliação, o painel sensorial treinado fornece resultados de baixa resolução, impedindo o desenvolvimento de modelos matemáticos mais precisos e estudos mais rápidos para definição do prazo de validade;
- para esses estudos, métodos instrumentais não são geralmente utilizados devido à dificuldade envolvida na extração da fragrância e ao custo de instrumentação, mão de obra, além do tempo de análise, principalmente a etapa de extração;
- todas as considerações acima mencionadas restringem a evolução dos protocolos de estudos de prazo de validade hoje utilizados pela indústria de sabonetes, impedindo o lançamento de novos produtos em períodos de tempo

menores, bem como desperdiçando recursos (pessoas, tempo e dinheiro) em estudos pouco exatos.

I. 5. QUIMIOMETRIA

A quimiometria, segundo a Sociedade Internacional de Quimiometria, é a área da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada, fornecendo o máximo de informações químicas com a análise dos dados [46].

De todos os ramos da química clássica, talvez a química analítica tenha sido a mais afetada pelo desenvolvimento recente da instrumentação química associada a computadores. De fato, a *Chemometrics Society*, organização internacional dedicada ao uso e desenvolvimento de métodos em quimiometria, é composta principalmente por químicos interessados em problemas analíticos. Atualmente, é muito raro encontrar qualquer periódico respeitável sobre pesquisas em química analítica que não traga artigos reportando dados obtidos com o auxílio de microcomputadores ou tratados por matemática multivariada ou métodos estatísticos, sempre com o objetivo de melhorar a qualidade dos resultados ou facilitar a sua interpretação [47].

Diversos são os métodos estatísticos usados no tratamento dos dados multivariados e entre eles destaca-se a análise por componentes principais ou PCA (*Principal Component Analysis*).

I. 5. 1. ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A análise por componentes principais é a base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados. Trata-se de uma importante ferramenta de compressão de dados que permite a redução da dimensionalidade original, sem perda de informação relevante [48].

O conjunto de dados a ser analisado é organizado em uma matriz de dados $\mathbf{X} \in \mathfrak{R}^{N \times P}$, em que N representa o número de amostras e P o número de variáveis⁶. O objetivo da análise por componentes principais na matriz \mathbf{X} é, em geral, simplificar, reduzir a dimensão original dos dados, modelar, detectar amostras anômalas (*outliers*), selecionar as variáveis de maior importância, classificar e prever dados [49].

Quando essa análise é aplicada, a matriz \mathbf{X} é representada como o produto de duas matrizes distintas, $\mathbf{T} \in \mathfrak{R}^{N \times F}$ e $\mathbf{L} \in \mathfrak{R}^{F \times P}$, em que F representa o número de dimensões do novo espaço, além de uma matriz de resíduos, \mathbf{E} :

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{L}^T + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 9})$$

Isso corresponde a projetar \mathbf{X} em um novo espaço de F dimensões. Quando o número de componentes principais, PC (*Principal Component*), ou fatores, F , é pequeno quando comparado a N e P , essa modelagem possibilita uma considerável redução da dimensionalidade e simplificação dos dados. E quando os resíduos, \mathbf{E} , são pequenos, quando comparados com a variação em \mathbf{X} , o modelo criado é uma boa representação de \mathbf{X} [50].

A matriz \mathbf{T} , Equação 9, é a matriz de *scores* e descreve a projeção das N amostras no novo espaço de F dimensões, definido pela matriz de *loadings* \mathbf{L} . Os *scores* são as novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos das componentes principais, enquanto os *loadings* expressam o peso ou contribuição de cada variável original na obtenção do novo sistema de eixos [48 – 52].

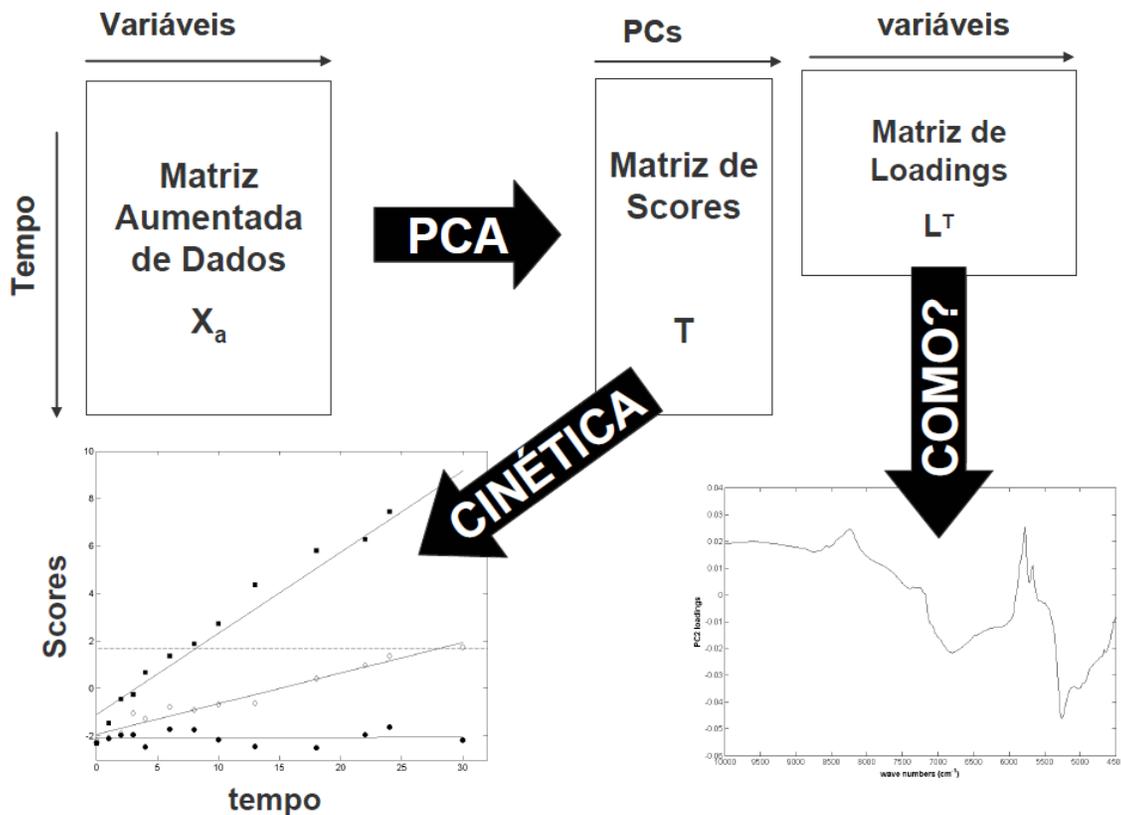
Além disso, a primeira componente principal, PC1, é a combinação linear de máxima variância (isto é, de máxima informação) das variáveis originais. A segunda componente, PC2, é ortogonal a PC1 e contém a segunda maior

⁶ Seguindo a convenção em álgebra linear, neste trabalho arranjos foram representados por letras maiúsculas sublinhadas em negrito, matrizes por maiúsculas em negrito, vetores por letras minúsculas em negrito e escalares por minúsculas em itálico. As dimensões de arranjos, matrizes e vetores foram representadas por letras maiúsculas em itálico.

variância. A terceira, PC3, apresenta a terceira maior variância e é ortogonal às duas primeiras PCs, e assim sucessivamente. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, a informação relevante fica concentrada nas primeiras PCs [50].

I. 5. 2. *MULTIVARIATE ACCELERATED SHELF-LIFE TEST (MASLT)*

O MASLT é um método quimiométrico de análise de dados multivariados, desenvolvido por PEDRO [40], com o objetivo de modelagem e previsão dos métodos cinéticos e da teoria clássica para determinação do prazo de validade de bens de consumo. Ele permite o uso direto de dados obtidos a partir de métodos instrumentais e baseia-se na compressão do espaço definido pelas variáveis originais através de uma PCA, de onde as informações relativas aos padrões de degradação do produto no tempo serão extraídas. Os *scores* de cada componente principal são utilizados como a propriedade de interesse P (vide Equação 4) no cálculo dos parâmetros cinéticos, enquanto que os *loadings* são utilizados para interpretar quais variáveis tiveram influência significativa na alteração do produto (Figura 3) [40].



Reproduzido com autorização de PEDRO [40]

Figura 3 – Representação do MASLT.

Duas premissas importantes desse método são:

- a alteração do produto em função do tempo constitui a principal fonte de variação do conjunto de dados (uma vez que as amostras sejam idênticas no momento da armazenagem e que as condições de estocagem sejam controladas adequadamente, a PCA será orientada por fenômenos relacionados ao tempo);
- como o método utiliza uma PCA para análise dos dados, as componentes principais são extraídas em ordem decrescente de variância explicada, fazendo com que as primeiras PCs tragam informações relativas à

degradação do produto, enquanto as demais explicam ruídos instrumentais ou processos não relacionados ao tempo [40].

O potencial do método MASLT para análise de dados físico-químicos, sensoriais e espectroscópicos e determinação do prazo de validade de bens de consumo foi publicado em 2009 por PEDRO [40], com aplicações envolvendo um produto industrializado concentrado de tomate e um produto cosméticos (loção corporal) [40].

I. 5. 2. 1. ALGORITMO DO MASLT

O MASLT é executado de acordo com as seguintes etapas [40]:

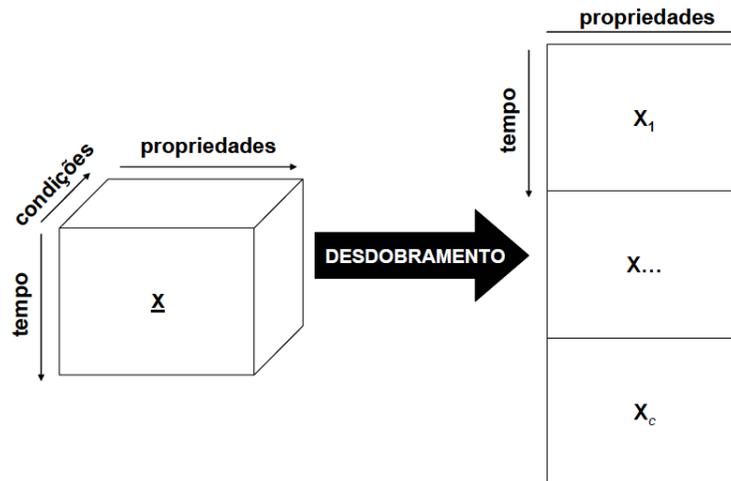
1. Os dados são organizados em um arranjo do tipo $\underline{\mathbf{X}} \in \mathfrak{R}^{N \times K \times C}$, onde N é o número de amostragem no tempo por condição de estocagem, K é o número de variáveis e C denota o número de condições de estocagem;
2. O arranjo $\underline{\mathbf{X}}$ é desdobrado nas condições de estocagem para formar a matriz aumentada $\mathbf{X} \in \mathfrak{R}^{CN \times K}$ (Figura 4)⁷;
3. Se necessário, procedimentos de pré-processamento são aplicados na matriz \mathbf{X} e a matriz \mathbf{X}_a é obtida;
4. Uma PCA é realizada na matriz \mathbf{X}_a de modo a obter as matrizes de *scores* (\mathbf{T}) e *loadings* (\mathbf{L}), bem como a tabela de variância explicada para cada PC. As primeiras R PCs, que descrevem a maior quantidade de variância do conjunto de dados originais, são selecionadas;
5. A matriz $\mathbf{T} \in \mathfrak{R}^{CN \times R}$ é separada em C matrizes $\mathbf{T}_c \in \mathfrak{R}^{N \times R}$ distintas;

⁷ Para utilização do MASLT, os dados devem ser organizados de maneira apropriada para que informações relativas ao tempo e às condições de estocagem sejam mantidas na PCA.

6. São construídos gráficos de *scores vs. tempo* para as R PCs que capturam a maior quantidade de variância e são identificadas as que têm relação temporal;
7. Para as PCs relacionadas com o tempo, são identificadas as ordens de reação e determinados os parâmetros cinéticos multivariados, utilizando os *scores* como propriedades nas Equações 4 a 8;
8. Os gráficos de *loadings* das PCs relacionadas com o tempo são construídos e os comportamentos observados são relacionados com fenômenos de degradação do produto;

Se o perfil de uma amostra limítrofe (ponto de corte) estiver disponível, os *loadings* são usados para calcular os parâmetros multivariados de corte das PCs relacionadas com o tempo, como segue:

9. As características da amostra limítrofe são concatenadas no vetor $\mathbf{x}^T \in \mathfrak{R}^{1 \times K}$;
10. A mesma rotina de pré-processamento realizada na etapa 3 é executada novamente sobre o vetor \mathbf{x} ;
11. A matriz de *loadings* é utilizada o cálculo dos *scores* de corte para cada PC:
$$\mathbf{t}_{\text{crit}}^T = \mathbf{x}_a^T \mathbf{L} \quad (\text{Equação 10})$$
onde $\mathbf{t}_{\text{crit}}^T$ é o vetor de *scores* críticos ou de corte, \mathbf{x}_a é um vetor linha e \mathbf{L} é a matriz de *loadings* obtida na etapa 4;
12. Finalmente, a validade estimada do produto é calculada através da projeção do *score* de corte da condição acelerada na condição de mercado [40].



Reproduzido com autorização de PEDRO [40]

Figura 4 – Procedimento de desdobramento do arranjo de dados X nas condições de estocagem.

I. 5. 3. PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS

Com o objetivo de eliminar fontes de variação de pouco interesse, como efeitos de linha de base, translações e rotações dos dados, pré-processamentos são realizados nos dados originais na maioria das vezes.

O pré-processamento mais simples e comum, bem como amplamente utilizado nos dados de espectroscopia, consiste em centrar os dados na média. Basicamente, subtrai-se o elemento de cada coluna pelo valor médio dos elementos dessa coluna, obtendo-se como resultado uma matriz na qual todos têm média zero. Esse procedimento translada o sistema de origem até o centro do conjunto de dados e tem por objetivo evitar que durante a PCA uma das PCs seja empregada apenas para esse fim, ou seja, para descrever a translação [53].

Outro exemplo de pré-processamento é método OSC (*Orthogonal Signal Correction*). Esse método foi originalmente desenvolvido para aplicações envolvendo dados de Espectroscopia no Infravermelho Próximo e tem por objetivo

remover variações do conjunto de dados (principalmente ruído instrumental) que não estejam relacionadas às propriedades de interesse, mas que poderiam interferir no modelo a ser obtido [54].

I. 5. 4. PRÉ-TRATAMENTO

Em algumas situações, transformações são realizadas nos dados para remover matematicamente fontes de variação indesejáveis. Entre estas transformações destaca-se o algoritmo COW (*Correlation Optimized Warping*), muito usado no processo de alinhamento de picos cromatográficos, espectroscópicos e de ressonância magnética nuclear [55, 56].

Em poucas palavras, o algoritmo COW realiza o alinhamento dividindo o cromatograma em diversos segmentos que sofrem deformações lineares (sendo esticados ou contraídos) chamadas de *warping*, em combinação com interpolações, otimizando os coeficientes de correlação entre os segmentos correspondentes aos cromatogramas de referência (determinado pelo usuário) e da amostra [55, 56].

I. 6. MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE FRAGRÂNCIAS

Como mencionado anteriormente, existem diferentes técnicas empregadas para separação ou extração de fragrância, entre elas as técnicas de *headspace* e microextração em fase sólida, utilizadas no caso de análise de fragrâncias em sabonetes em barra [57] e empregadas no presente trabalho.

I. 6. 1. HEADSPACE ESTÁTICO E DINÂMICO

A extração por *headspace* considera o confinamento (com ou sem aquecimento e/ou agitação) da amostra em um recipiente fechado (geralmente um *vial*) e coleta dos compostos voláteis presentes na parte superior do frasco (*headspace*) [57 – 59].

Os métodos de extração por *headspace*, estático ou dinâmico, são amplamente aplicados para extração de fragrâncias [57 – 59]. Em um artigo publicado em 2006, JURGENS *et al.* [20] usaram *headspace* dinâmico para coletar os voláteis emitidos pelas flores da planta *Apocynaceae*, visando um melhor entendimento do papel que esses odores exercem na atração de agentes polinizadores. As flores foram colocadas em sacos de polietileno e os voláteis emitidos foram coletados em tubos adsorventes preenchidos com uma mistura de Tenax-TA® e Carbotrap®. As amostras foram dessorvidas termicamente e analisadas por GC-MS. Foram detectados 170 diferentes compostos voláteis e destes 128 foram identificados. Os resultados levaram os autores a concluir que as espécies dessas plantas podem ser divididas em dois grupos: (i) espécies dominadas por monoterpenóides (linalol, ocimeno), (ii) espécies dominadas por benzenóides (benzaldeído, fenilacetaldéido, acetato de 2-feniletila). As espécies contendo esses dois grupos de compostos são polinizadas pelas mesmas espécies de *Hymenoptera* (vespas e abelhas) e *Lepidoptera* (borboletas e mariposas) e, possivelmente, esses insetos são atraídos por ambos, monoterpenóides e benzenóides. Por outro lado, espécies dominadas somente por benzenóides atraem um grupo específico de agentes polinizadores (espécies específicas de *Hymenoptera* e *Lepidoptera*), diferente daquele atraído por espécies dominadas exclusivamente por monoterpenóides [20].

Os pesquisadores da empresa Firmenich, a segunda maior casa de fragrâncias do mundo [7], publicaram em 2010 um artigo relatando o uso de *headspace* dinâmico para monitorar a liberação de fragrâncias em toalhas de

algodão em tempo real. Um sistema inovador foi construído, usando um sistema criogênico modulado longitudinalmente e montado ao redor de um *loop* de amostragem. Verificou-se que o sistema é adequado para análises de compostos com ponto de ebulição entre 190 e 320 °C, que é o caso da maioria das matérias primas usadas em perfumaria. O novo dispositivo foi usado com sucesso para monitorar a liberação de oito compostos odoríferos presentes em toalhas de algodão tratadas com um agente amaciante contendo fragrância. Os ensaios foram realizados na temperatura de 25 °C e um LTMGC (*Low Thermal Mass Gas Chromatography*) foi utilizado para a caracterização dos compostos [21].

I. 6. 2. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A técnica de SPME é baseada na adsorção de analitos (coletados diretamente na amostra, SPME, ou em *vials* de *heapspace*, HS-SPME) em um filme de uma fase extratora imobilizado sobre a superfície de uma fibra de sílica fundida. Os extratos podem ser dessorvidos termicamente ou com auxílio de solventes. Algumas das vantagens desse tipo de extração são: o não uso de solventes (para o caso de dessorção térmica), alto poder de concentração dos analitos de interesse e a combinação da extração, pré-concentração e introdução da amostra em uma única etapa. As principais desvantagens da técnica, por outro lado, incluem a fragilidade da fibra, resultando em reduzido tempo de uso, e seu alto custo, além de problemas de efeito de memória e baixa reprodutibilidade [56 – 58, 60 – 61].

Em 1989, o desenvolvimento da técnica de microextração em fase sólida, por BELARDI e PAWLISZYN [22], foi um importante marco na área de extração de fragrâncias. ZAKARIA *et al.* [23] publicaram em 2010 um artigo comparando três diferentes técnicas de extração de fragrâncias: hidrodestilação, extração Soxhlet e microextração em fase sólida, SPME. As três técnicas foram utilizadas para extrair os compostos ativos responsáveis pela fragrância das flores de *Citrus grandis*. A

hidrodestilação foi realizada a 100 °C, seguida de uma extração com diclorometano. No caso da extração Soxhlet, as amostras foram submetidas a 3 horas de extração, novamente utilizando diclorometano como solvente. Para SPME, três diferentes fibras foram usadas: PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno), CAR/PDMS (Carboxen®/polidimetilsiloxano), e PDMS (polidimetilsiloxano). Todas as amostras obtidas pelas três diferentes técnicas de extração foram caracterizadas por GC-MS. Na técnica de hidrodestilação, os teores de ocimeno e linalol detectados nas flores foram maiores que nos brotos em 7,37% e 15,93%, respectivamente e o limoneno foi o composto majoritário detectado nos brotos (4,57%). Com a extração Soxhlet, a composição dos brotos foi determinada como 27,25% de limoneno, 5,55% de ocimeno e 2,97% de linalol. Algumas diferenças foram encontradas nos cromatogramas obtidos a partir das amostras de hidrodestilação e Soxhlet. A água é um solvente polar e acelera muitas reações, incluindo a degradação de fragrâncias por hidrólise. Assim, a ausência de água na extração Soxhlet evita a degradação dos compostos, com menos produtos de degradação sendo observados nesses cromatogramas. Os desempenhos das três diferentes fibras de SPME foram comparados com relação à recuperação de voláteis e a fibra de PDMS se mostrou a mais eficaz. Segundo os autores, SPME combinada com GC-MS representa uma técnica simples, rápida, altamente sensível e que dispensa o uso de solventes, sendo uma ótima alternativa para substituir as técnicas convencionais para análise de voláteis [23].

LAMAS *et al.* [24] publicaram em 2009 um artigo no qual descrevem o uso de SPME e GC-MS para determinação de compostos alergênicos provenientes de fragrância em água de banho de bebês. Vários parâmetros foram avaliados através de um planejamento fatorial, que forneceu como resposta a eficiência da extração. O método final foi definido como amostragem por *headspace* a 100 °C, por 20 minutos, usando fibra de DVB/PMDS (divinilbenzeno/polidimetilsiloxano),

com adição de 2 g de NaCl. O método mostrou boa linearidade e precisão para todos os compostos analisados, com limites de detecção variando de 0,001 a 0,3 ng/mL. Nove amostras de água de banho foram analisadas e quinze diferentes compostos alergênicos provenientes de fragrância foram encontrados, entre eles linalol, limoneno, pineno e citral [24].

Em 2010, esses mesmos autores, LAMAS *et al.* [25], publicaram outro artigo citando o uso de extração em fase sólida seguida de microextração em fase sólida (SPE-SPME) para a análise de vinte e quatro compostos alergênicos provenientes de fragrância no ar de ambientes fechados. Durante o processo de SPE, amostras de ar (coletadas de diversos ambientes internos: cozinhas, banheiros, quartos, etc.) foram bombeadas através de um funil de vidro contendo Florisil®. Feito isso, o adsorvente foi transferido para *vials* e submetido à SPME, utilizando condições otimizadas previamente definidas. As amostras foram caracterizadas por GC-MS. O método otimizado apresentou alta exatidão (recuperação acima de 85%) e precisão (desvio padrão relativo abaixo de 15%) e limite de detecção abaixo de 4 ng/m³. Quatorze dos vinte e quatro analitos identificados pelo SCCNFP (*Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products*) como compostos alergênicos provenientes de fragrâncias foram identificados nas amostras de ar analisadas, em concentração da ordem de µg/m³ em alguns casos. Quatro desses compostos, álcool benzílico, linalol, ionona e lillial, foram encontrados em quase todos os ambientes, chamando a atenção para a presença deles em locais fechados [25].

Em 2007, PEDERSEN-BJERGAARD *et al.* [26] publicaram um relatório sobre o nono *ExTech (Extraction Technologies) Symposium*, que ocorreu nesse mesmo ano na Dinamarca. PAWLISZYN, um dos responsáveis pelo desenvolvimento da técnica de SPME, era um dos palestrantes nesse evento e apresentou um dispositivo para uso de SPME a frio para extração de fragrâncias. Os resultados apresentados pelo pesquisador demonstraram que o uso de SPME

a frio resulta em maior detectabilidade quando comparado à técnica convencional. Os autores desse artigo citaram que diversas outras apresentações durante o congresso demonstraram o grande potencial da técnica de SPME como poderosa ferramenta para extração de fragrâncias [26].

I. 7. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE FRAGRÂNCIAS

I. 7. 1. CROMATOGRAFIA GASOSA E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A definição geral da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*) para cromatografia é: “... um método, usado primariamente para a separação dos componentes de uma amostra, no qual os componentes são distribuídos entre duas fases, sendo uma delas estacionária, enquanto a outra se move. A fase estacionária pode ser um sólido, um líquido sobre um suporte, ou um gel. A fase estacionária pode ser acondicionada em uma coluna, espalhada como uma camada, ou distribuída como um filme ... A fase móvel pode ser gasosa ou líquida.” [62].

Dentre as diversas modalidades existentes, a Cromatografia Gasosa é intensivamente utilizada, sendo uma poderosa técnica de separação para análise de compostos voláteis, bem como uma ferramenta analítica bastante versátil, podendo ser utilizada com diferentes tipos de detectores, seletivos ou universais, tais como o detector por captura de elétrons (ECD – *Electron Capture Detector*), o detector de massas (MS – *Mass Spectrometer*), o detector por ionização em chama (FID – *Flame Ionization Detector*), entre outros [58].

A popularização da GC (*Gas Chromatography*) mudou profundamente a indústria de fragrâncias, eliminando as fórmulas secretas, intensificando a competição, aumentando a preocupação com segurança e meio ambiente e, é claro, refinando o desempenho das medidas analíticas [4]. Todos os artigos mencionados anteriormente utilizam a cromatografia como técnica analítica para a detecção de fragrâncias, na maioria das vezes, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Em um artigo publicado em 2002, ASTEN [30] cita a importância da cromatografia gasosa e da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para análise de perfumes no meio industrial. Tanto empresas de perfumes quanto de cuidados para casa e higiene pessoal dependem de GC e GC-MS para revelar a composição de fragrâncias, realizar controle de qualidade, analisar produtos de concorrentes (abertura de fórmula) e analisar substâncias presentes em baixíssimas concentrações, tanto no substrato quando no *headspace*. O estado da arte de formulações de perfumes é baseado no índice de Kovats (KI – *Kovats Index*) e nas bases de dados de espectrometria de massas. Para determinar a composição de uma amostra de fragrância, as empresas se baseiam em cromatografia gasosa usando coluna capilar e dois diferentes detectores: FID e espectrômetros de massas. A amostra de fragrância é, após diluição apropriada, analisada em pelo menos duas colunas capilares e as colunas de PDMS (polidimetilsiloxano, fase apolar) e PEG (polietilenoglicol, fase polar) são as mais usadas para esse propósito. Na composição de uma fragrância, numerosos ingredientes podem estar presentes em níveis baixos (< 1%) e, ainda assim, serem de grande importância olfativamente ou economicamente. Ou seja, a sensibilidade é um aspecto muito importante nas análises por GC e GC-MS e os métodos utilizados são otimizados com o objetivo de melhorar a resolução, mesmo que isso exija longos tempos de análise [30].

Ocasionalmente, extratos ou fragrâncias contêm novos ingredientes que ainda não estão disponíveis comercialmente e são usados pelas empresas de

perfumes como vantagem competitiva. Amostras desses novos ingredientes não podem ser obtidas. Conseqüentemente, para maior conhecimento sobre o novo composto, a elucidação de sua estrutura é requerida. Para isso, MS (*Mass Spectrometry*) exerce um papel crucial, visto que as quantidades do novo ingrediente utilizadas em uma formulação são pequenas demais para permitir identificação via NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), por exemplo. O espectro de EI-MS (*Electrical Ionization-Mass Spectrometry*) pode ser bastante informativo, mas frequentemente não traz todas as informações necessárias para uma identificação positiva. A ionização química (CI – *Chemical Ionization*) pode ser utilizada para determinar a massa molar do analito desconhecido, especialmente para moléculas que são extensivamente fragmentadas durante a EI [31].

Em 2007, SANT'ANNA *et al.* [63] citaram o uso de GC-MS e GC-FID para a caracterização de óleo de copaíba, utilizado como matéria prima na indústria de fragrâncias. A fim de identificar as substâncias fragrantes presentes no óleo, a técnica GC-O-MS (*Gas Chromatography-Olfactometry-Mass Spectrometry*) utilizando AEDA (*Aroma Extract Dilution Analysis*) foi aplicada após a quantificação dos compostos por GC-FID. Os resultados obtidos apontaram para a presença de δ -cadineno (1,9%), δ -cadinol (0,9%), óxido de cariofileno (0,2%), (*Z*)- α -santalol (0,2%), α -cadinol (0,1%) e τ -muurolol (0,1%). A contribuição aromática dos enantiômeros do δ -cadineno também foi analisada por GC-O-MS-quiral e somente o enantiômero (+)- δ -cadineno foi encontrado no óleo [63].

Novamente em 2007, PIETROGRANDE e BASAGLIA [31] publicaram um artigo sobre o uso de GC-MS para a análise de produtos de higiene pessoal em matrizes aquosas, sendo fragrâncias, mais especificamente almíscares sintéticos, um dos analitos de interesse. Dois tipos de almíscares sintéticos são largamente usados na Europa e América do Norte: almíscares policíclicos e nitroalmíscares. Eles podem ser encontrados em quase todos os produtos de higiene pessoal (perfumes, cosméticos e sabonetes) e representam um risco ao meio ambiente,

pois são levados para os efluentes após ou durante o uso dos produtos (durante o banho, por exemplo). Os autores citaram o uso de ionização química, nos modos positivo (PCI – *Positive Chemical Ionization*) e negativo (NCI – *Negative Chemical Ionization*), usando metano como reagente, para a detecção dos dois almíscares sintéticos citados. Usando um espectrômetro de massas com quadrupolo, os desempenhos de EI, PCI e NCI foram investigados para a análise de almíscares: NCI apresentou-se como o método mais sensível, seguido de EI e PCI. O uso de NCI aumenta a detectabilidade de tal forma que o método atinge um limite de detecção comparável à detecção usando *ion-trap* MS2 (ou seja, cerca de 2 pg para a maioria dos compostos) [31].

I. 7. 2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Os raios-X, descobertos por Wilhelm Röntgen, em 1895 [64], compõem uma forma de radiação eletromagnética de pequeno comprimento de onda, capaz de produzir espectros com linhas características quando interage com a matéria.

Uma das técnicas analíticas que considera o uso desse tipo de radiação é a Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X, bastante conhecida por sua habilidade em identificar e quantificar espécies inorgânicas, de forma não destrutiva, rápida, simples e de baixo custo. Também é possível, com essa mesma técnica, analisar compostos orgânicos, usando equipamentos convencionais, mas observando, com o auxílio da quimiometria, especificamente a região de espalhamento da fonte de radiação [64 – 66].

Quando um feixe monocromático de fótons de raios-X atinge uma amostra, podem ocorrer três fenômenos básicos simultaneamente: espalhamento, absorção e fluorescência [64 – 66].

A fluorescência é baseada no efeito fotoelétrico, que, resumidamente, é a liberação de um elétron pela ação de um fóton, sendo mais intenso para elementos com número atômico alto [64 – 66].

Já o processo de espalhamento ocorre quando um fóton de raios-X interage com os elétrons do elemento “alvo”. Quando esta interação é elástica, isto é, quando não há perdas de energia durante o processo de colisão, o espalhamento é chamado de espalhamento coerente (ou espalhamento Rayleigh). Por outro lado, quando os fótons espalhados perdem uma pequena parte de sua energia durante a colisão, o espalhamento é chamado de espalhamento incoerente (ou espalhamento Compton) [64 – 66].

Visto que não existem registros quanto ao uso da Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X para determinação do prazo de validade de bens de consumo, esse trabalho é inédito e baseia-se em aplicações já publicadas da técnica para análise de amostras orgânicas [67 – 68], bem como o uso reportado de Espectroscopia Raman para análise de prazo de validade de fármacos e qualidade de alimentos [69 – 71].

WANG *et al.* [69] usaram a Espectroscopia Raman para monitorar o prazo de validade de amostras de aspirina em comprimidos, através da determinação de ácido salicílico gerado por decomposição. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles gerados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) e verificou-se que ambos os métodos eram adequados para a aplicação proposta, com a vantagem de que, no caso de Raman, a reprodutibilidade era maior, as análises mais rápidas, além de não envolver uso de solvente [69].

BEATTIE *et al.* [70] descreveram o uso da espectroscopia Raman como ferramenta para prever a qualidade de amostras de carne. Diferentes amostras de carne cozida foram avaliadas por um painel sensorial treinado e também por espectroscopia Raman. Os resultados obtidos demonstraram que a espectroscopia Raman pode ser usada para esse fim, constituindo um método não destrutivo e rápido para análise de parâmetros de qualidade relacionados à carne [70]. COMPTON e COMPTON [71] demonstraram o uso da espectroscopia FT-

Raman para análise de controle de qualidade de amostras embaladas de bens de consumo (preparados farmacêuticos e alimentos). As análises foram feitas sem remoção das embalagens e mostraram o potencial da técnica para esse uso [71].

I. 7. 3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

A Espectroscopia no Infravermelho Próximo é uma técnica barata, rápida, e uma fonte confiável de informação química para determinação do prazo de validade de bens de consumo, fornecendo informações a respeito da degradação do produto como um todo. Os espectros de infravermelho são originados por diversas variações de energia causadas por transições moleculares vibracionais ou rotacionais e são baseados no conceito de que as ligações entre os átomos que formam as moléculas vibram com frequências que podem ser descritas por leis físicas e, portanto, calculadas [72, 73].

No caso de Infravermelho Próximo, os sinais observados são essencialmente devidos a dois fenômenos: bandas de absorção de *sobretons* (entre 12800 e 5500 cm^{-1}) e bandas de combinação (entre 5500 e 4000 cm^{-1}) [72, 73].

Apesar de poucos registros de uso da técnica de Espectroscopia no Infravermelho Próximo para a determinação do prazo de validade de bens de consumo, ela já foi aplicada inclusive para o caso de um produto cosmético [74] e, por essa razão, foi proposta para esse estudo.

A técnica também já foi aplicada em alguns estudos relacionados ao prazo de validade na área de alimentos. A primeira utilização nesse campo ocorreu quase duas décadas atrás, quando CHEN *et al.* [75] determinaram uma correlação entre o padrão de alteração dos espectros no infravermelho próximo e a degradação da mioglobina em produtos de frango, prevendo o frescor da carne. NIELSEN *et al.* adotaram estratégia similar para prever o frescor em peixes [76]. GIARDINA *et al.* também utilizaram a técnica para estudar o efeito da temperatura

INTRODUÇÃO

e do tempo de estocagem na qualidade final de amostras de leite sem lactose [77], e também desenvolveram estudos para estimar o prazo de validade de amostras de diferentes tipos de queijo a partir do uso dessa técnica [78, 79].

II – OBJETIVOS

“Life is not measured by the number of breaths we take, but by the moments that
take our breath away.”

(Anônimo)

II. 1. OBJETIVOS

Desenvolvimento de um método alternativo à avaliação sensorial para análise de perda de fragrância em sabonetes em barra, considerando:

- a avaliação de diferentes técnicas analíticas instrumentais (Microextração em Fase Sólida por *Headspace* e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas; Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X; Espectroscopia no Infravermelho Próximo);
- o uso do método quimiométrico MASLT (*Multivariate Accelerated Shelf-Life Test*) para análise multivariada dos dados;
- acelerar a aquisição dos dados necessários para a determinação do prazo de validade desse tipo de produto.

III – EXPERIMENTAL

"O segredo da saúde, mental e corporal, está em não se lamentar pelo passado, não se preocupar com o futuro, nem se adiantar aos problemas, mas, viver sabiamente e seriamente o presente."

(Buda)

III. 1. REAGENTES

Todos os experimentos foram realizados com reagentes de pureza analítica igual ou superior a 99%.

A água deionizada utilizada apresentava resistividade de 18 MΩ/cm e foi obtida através de um sistema de purificação por coluna contendo uma combinação de resinas de troca iônica (catiônica e aniônica), marca Merck Millipore, modelo Milli-Q Direct.

III. 2. MATERIAIS

- Vials de vidro, 20 mL, com septo de teflon e lacre de alumínio, Gerstel GmbH & Co.;
- Fibra SPME composta de polidimetilsiloxano (PDMS), 100 μm, Sigma-Aldrich Co.;
- Fibra SPME composta de polidimetilsiloxano / divinilbenzeno (PDMS / DVB), 65 μm, Sigma-Aldrich Co.;
- Fibra SPME composta de divinilbenzeno / carboxeno / polidimetilsiloxano (DVB / CAR / PDMS), 50/30 μm, Sigma-Aldrich Co.;
- *Holder* Gerstel GmbH & Co.

III. 3. EQUIPAMENTOS

- Balança analítica, marca Sartorius, modelo ED224S;
- Estufas (câmaras climáticas), marca Nova Ética, modelo CLI02;
- Titulador Karl Fisher, marca Metrohm, modelo Titrando 852;

- Espectrômetro de fluorescência de raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF – *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*), marca Shimadzu, modelo EDX-700, constituído por um tubo de Rh e um detector semi-condutor de Si(Li);
- Espectrômetro no infravermelho próximo, marca Büchi, modelo NIRFlex N-500 FT-NIR, com detector InGaAs e equipado com o módulo de sólidos NIRFlex;
- Cromatógrafo a gás, marca Agilent, modelo 6890N, equipado com um detector de massas, mesma marca, modelo 5975, um amostrador automático, marca Gerstel, modelo MPS2, e uma coluna do tipo HP-5MS, 5% fenil metil siloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,2 µm, marca Agilent;

III. 4. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS E ALGORITMOS

- Chemstation, versão A.10.01, Agilent Technologies: empregado na aquisição e exportação dos dados cromatográficos;
- MatLab, versão 7.8, The MathWorks Inc.: utilizado para tratamento quimiométrico dos dados;
- Algoritmo MASLT: desenvolvido por PEDRO [40] e programado pela autora;
- Algoritmo COW: disponível em http://www.models.life.ku.dk/DTW_COW;
- Algoritmo OSC: PLS Toolbox, versão 2.0, Eigenvector Technologies Inc.

III. 5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

III. 5. 1. CRIAÇÃO DA FRAGRÂNCIA

A fragrância utilizada nesse trabalho foi criada por um perfumista, que definiu os compostos químicos a serem utilizados, bem como suas respectivas quantidades, com base: i) em seu conhecimento em perfumaria e ii) nas composições de fragrâncias comerciais tipicamente usadas em sabonetes em barra.

A elaboração da fragrância envolveu a pesagem e mistura dos oito compostos químicos citados na Tabela 1, utilizando padrões de grau de pureza superior a 99%.

EXPERIMENTAL

Tabela 1. Composição da fragrância utilizada.

Composto Químico	Concentração (% m/m)	Ponto de Ebulição (°C a 759,8 mmHg)	Pressão de Vapor (mmHg a 20 °C)
Acetato de Hexila CAS number: 142-92-7	1,2	171,5	1,000
Acetato de Benzila CAS number: 2550-26-7	12,0	235,0	0,100
Citronelol (3,7-dimetil-oct-6-en-1-ol) CAS number: 106-22-9	21,5	223,0	0,100
Diidromircenol (2,6-dimetil-7-octen-2-ol) CAS number: 18479-58-8	12,0	188,4	0,090
Fenil etanol (2-fenil etanol) CAS number: 60-12-8	12,0	219,0	0,030
Lilial (3-(4-terc-butilfenil)-2-metilpropanal) CAS number: 80-54-6	37,0	279,0	0,004
Limoneno (1-metil-4-isopropenilcicloex-1-eno) CAS number: 5989-27-5	1,8	176,0	1,200
B-pineno (6,6-dimetil-2-metileno biciclo [3.1.1] heptano) CAS number: 18172-67-3	2,5	165,0	2,200

Fonte: *Research Institute for Fragrance Materials Database.*

III. 5. 2. PRODUÇÃO DOS SABONETES EM BARRA

Amostras de sabonete em barra foram preparadas considerando o processo convencional de produção desse produto (mexedeira, cilindro, extrusora e prensa) [2]. A formulação de sabonetes empregada foi: 85% de sabão de sódio (utilizando uma mistura de óleo de palma e óleo de semente de palma (80/20) como fonte de material graxo), 13,5% de água, 1,2% da fragrância descrita no item III.5.1., além de agentes quelantes.

Após produção, as barras (90 g cada) foram embaladas em caixinhas de papelão (idênticas às embalagens comerciais para esse tipo de produto) e estocadas, após 15 dias de maceração⁸, em cinco diferentes câmaras climáticas reguladas para as temperaturas de 8, 27, 37, 45 e 60 °C⁹, onde permaneceram até serem analisadas em intervalos de 3 a 5 dias no início e a cada 15 dias a partir de 30 dias de estocagem.

Para realização das análises, as amostras foram retiradas da estufa com 4 horas de antecedência e deixadas em condição ambiente para estabilização da temperatura. Todas as análises e/ou replicatas foram realizadas com diferentes barras, ou seja, uma vez utilizada, a barra era descartada e uma nova barra inteira era utilizada para a próxima análise e/ou replicata.

Em todos os pontos de análise, os teores de umidade de amostras retiradas da superfície e do interior da barra foram analisados (titulação Karl Fischer, usando metanol como solvente).

⁸ Após sua produção, as barras de sabonetes são mantidas em repouso por um período de 15 dias, indicado pelas casas de fragrância com o objetivo de garantir melhor interação entre a base do sabonete e a fragrância.

⁹ As câmaras climáticas utilizadas apresentavam variação máxima de temperatura igual a ± 1 °C.

III. 5. 3. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

Para as análises por GC-MS, as amostras consistiam de pastilhas retiradas da superfície das barras de sabonete, sempre com a mesma massa e área superficial, controladas através de sua altura e diâmetro. As amostras foram retiradas da superfície porque essa é a área do sabonete avaliada pelo painel durante a avaliação sensorial, método convencional para estudos de prazo de validade de sabonetes em barra (no caso de fragrância).

O diâmetro das pastilhas foi fixado em 0,6 cm e padronizado através do uso de um cortador de amostras¹⁰ (Figura 5).

Pastilha retiradas do interior da barra (seguindo o mesmo procedimento acima) também foram analisadas, visando comparar a perda de fragrância na superfície e no interior do sabonete.

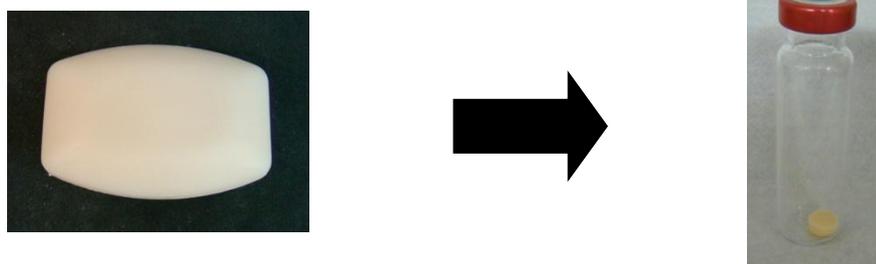


Figura 5. Preparação das amostras de sabonete para análise por HS-SPME-GC-MS.

Para avaliar o método de amostragem (as pastilhas retiradas da superfície da barra), um dispositivo de vidro (Figura 6) foi construído com o objetivo de

¹⁰ Um diâmetro de pastilha ainda maior não poderia ser utilizado devido à limitação das dimensões do *vial*.

EXPERIMENTAL

permitir a análise da barra inteira de sabonete, simulando a avaliação sensorial realizada pelo painel treinado.

As análises por GC-MS foram realizadas em duplicata¹¹, empregando a técnica de HS-SPME para extração e preparo das amostras. As análises foram realizadas no tempo inicial (tempo 0) e após 3, 6, 10, 14, 19, 24, 31, 45, 59, 74 e 87 dias de estocagem.



Figura 6. Jarro de vidro utilizado para a análise da barra inteira.

¹¹ As análises por HS-SPME-GC-MS não foram realizadas em triplicata porque no início do estudo (quando as amostras eram analisadas a cada 3-5 dias) não haveria tempo hábil para tal, uma vez que havia apenas um equipamento disponível (cromatógrafo a gás equipado com um detector de massas e amostrador automático para HS-SPME) e cada análise possuía duração de 116 minutos (40 minutos para preparo das amostras (HS-SPME) e 76 minutos para a corrida cromatográfica).

EXPERIMENTAL

As condições cromatográficas utilizadas foram¹²: temperatura inicial do forno 40 °C, mantida por 2 minutos, seguida de aquecimento de 2 °C / minuto até 140 °C e 5 °C / minuto até a temperatura final de 250 °C, mantida por 2 minutos. As temperaturas do injetor, auxiliar e detector foram mantidas a 270 °C, 280 °C e 230 °C, respectivamente. O injetor foi operado no modo *splitless*. Hélio, grau de pureza 99,9%, fornecido pela Linde Gases Ltda., foi utilizado como gás de arraste com vazão de 0,8 mL/min. O detector de espectrometria de massas foi programado para varrer a faixa de massas de 50 a 550 m/z, utilizando uma fonte de íons de 70 eV. *Solvent delay* de 0,2 minutos foi utilizado em todas as corridas.

Todas as extrações foram realizadas no *headspace* da amostra em *vials* de 20 mL. Experimentos variando fibra, massa da amostra, temperatura, tempo de equilíbrio e tempo de adsorção foram realizados para otimização das condições de extração.

Antes do uso, todas as fibras foram condicionadas por 1 hora a 250 °C, visando a limpeza e eliminação de contaminantes.

No caso do jarro de vidro, as amostras não foram feitas em replicata, devido à restrição do número de jarros de vidro disponíveis (cinco no total), e o procedimento utilizado foi:

- 1- O sabonete em barra, sem qualquer preparação ou pré-tratamento, foi colocado em um dos jarros de vidro (previamente limpo com álcool), que foi então fechado;
- 2- Uma fibra do tipo DVB/CAR/PDMS (vide item IV.1.1.) foi inserida através do septo de teflon existente na tampa do jarro (Figura 6);
- 3- A fibra foi exposta ao *headspace* existente no interior do jarro;

¹² As condições cromatográficas utilizadas foram baseadas em um método utilizado na indústria para análise de fragrância em sabonetes.

- 4- O conjunto todo (jarro contendo o sabonete e a fibra) foi então colocado em estufa a 45 °C (vide item IV.1.3.) e mantido nessa condição por 17 horas, tempo otimizado em estudo prévios;
- 5- Após esse período, o conjunto foi retirado da estufa, a fibra foi retraída, retirada do jarro e, imediatamente, inserida no injetor do cromatógrafo;
- 6- Os analitos presentes na fibra foram dessorvidos termicamente no injetor do cromatógrafo, seguindo os parâmetros de análise descritos anteriormente.

Após a obtenção dos cromatogramas, os mesmos foram processados na seguinte ordem: (i) os dados referentes a todos os cromatogramas obtidos foram organizados de acordo com as etapas necessárias para aplicação do algoritmo MASLT [40]; (ii) os dados foram normalizados; (iii) os cromatogramas foram alinhados utilizando o algoritmo COW (utilizando o cromatograma médio como vetor *target*, $N = 30$ e $s = 5$); (iv) a análise dos dados pelo método MASLT foi realizada.

Para as pastilhas, uma matriz de dados de 96 linhas (4 x 12 x 2, isto é, 4 diferentes temperaturas de estocagem¹³ (8, 27, 37 e 45 °C), 12 dias de análise (0, 3, 6, 10, 14, 19, 24, 31, 45, 59, 74 e 87 dias) e análises em duplicata) e 13231 colunas (tempos de retenção) foi obtida.

No caso do jarro, a matriz avaliada possuía 40 linhas (4 x 10 x 1, ou seja, 4 temperaturas de estocagem¹⁴ (8, 27, 37 e 45 °C) e 10 dias de análise (0, 3, 10, 19, 24, 31, 45, 59, 74 e 87 dias), sem replicata) e 13231 colunas (tempos de retenção).

¹³ Os dados referentes à temperatura de 60 °C não foram incluídos na análise (vide item IV.2.).

¹⁴ Novamente, os dados referentes à temperatura de 60 °C não foram incluídos na análise (vide item IV.2.).

III. 5. 4. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

No caso de Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X, as amostras também consistiam de pastilhas retiradas da superfície das barras de sabonete com o auxílio de um cortador de amostras com diâmetro fixo de 3 cm (determinado pelas características do porta amostras do equipamento) e sempre com a mesma altura (altura da barra de sabonete), ou seja, com massa e área superficial fixas.

As amostras, sem qualquer pré-tratamento, foram submetidas à análise em triplicata nos seguintes tempos: 0, 3, 5, 10, 14, 24, 31, 45, 59, 74 e 87¹⁵ dias de estocagem.

As condições gerais de análise foram 10 mm de colimação do feixe incidente, 50 kV de voltagem aplicada ao tubo de raios-X, 100 s de irradiação e 25% de tempo morto do detector.

Após a obtenção dos espectros, os mesmos foram processados na seguinte ordem: (i) os dados foram organizados de acordo com as etapas necessárias para aplicação do algoritmo MASLT [40]; (ii) os dados foram normalizados e, a seguir, centrados na média; (iii) os espectros foram analisados pelo método MASLT.

Uma matriz de dados de 132 linhas (4 x 11 x 3, ou seja, 4 temperaturas de estocagem¹⁶ (8, 27, 37 e 45 °C), 11 dias de análise (0, 3, 5, 10, 14, 24, 31, 45, 60, 74 e 87 dias), em triplicata) e 2047 colunas (energia) foi obtida nesse caso.

¹⁵ No caso de Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X, as análises referentes a 19 dias de estocagem não foram realizadas devido a um problema ocorrido no transporte das amostras até a Unicamp, onde o equipamento estava localizado.

¹⁶ Os dados referentes à temperatura de 60 °C não foram incluídos na análise (vide item IV.2.).

III. 5. 5. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

Para análise por Espectroscopia no Infravermelho Próximo, as amostras foram barras inteiras de sabonete, sem qualquer preparação ou pré-tratamento.

As amostras foram analisadas em triplicata, após 0, 3, 5, 10, 14, 19, 24, 31, 45, 59, 74 e 87 dias de estocagem.

As análises foram realizadas com o módulo de sólidos NIRFlex, considerando faixa espectral de 4.000 a 10.000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

Os espectros obtidos foram analisados empregando os seguintes passos: (i) os dados foram organizados de acordo com as etapas necessárias para aplicação do algoritmo MASLT [40]; (ii) os dados foram normalizados e, a seguir, centrados na média; (iii) os espectros foram corrigidos pelo método OSC; (iv) os dados foram analisados pelo método MASLT.

Os espectros organizados geraram uma matriz de 144 linhas (4 x 12 x 3, ou seja, 4 temperaturas de estocagem¹⁷ (8, 27, 37 e 45 °C), 12 dias de análise (0, 3, 5, 10, 14, 19, 24, 31, 45, 60, 74 e 87 dias) e análises em triplicata) e 1500 colunas (intensidade de reflectância).

III. 5. 6. AVALIAÇÕES SENSORIAIS

As amostras de sabonete em barra foram codificadas e entregues aos integrantes de um painel treinado formado por 10 pessoas, que deveriam analisá-las com relação ao caráter (identidade) e à intensidade da fragrância. A avaliação foi realizada comparando-se as amostras estocadas em temperaturas maiores com aquela estocada a 8 °C, denominada Padrão. Dentre as amostras avaliadas, havia sempre uma amostra Padrão codificada, visando eliminar avaliadores

¹⁷ Os dados referentes à temperatura de 60 °C não foram incluídos na análise (vide IV.2.).

inconsistentes (caso um avaliador classificasse a amostra Padrão codificada como diferente do Padrão, a sua avaliação era desconsiderada naquele ponto).

Os tempos de análise utilizados para avaliação sensorial foram 0, 3, 6, 10, 14, 19, 24, 31, 45, 59, 74 e 87 dias de estocagem e as escalas utilizadas na avaliação estão descritas na Tabela 2. Uma dada amostra foi considerada reprovada ao receber nota para caráter igual a D ou E e/ou intensidade maior ou igual a 4.

Para a análise multivariada dos dados instrumentais, o valor crítico da propriedade de interesse (fragrância) foi obtido a partir do ponto de corte do painel sensorial, projetando-se o tempo de vida, ou prazo de validade, da amostra (definido pelo painel) nos *scores* calculados [40].

Tabela 2. Escala utilizada na avaliação sensorial.

Caráter da Fragrância	Intensidade da Fragrância
A = Sem mudança com relação à amostra estocada a 8 °C (amostra Padrão)	1 = Sem mudança com relação à amostra estocada a 8 °C (amostra Padrão)
B = Mudança sutil	2 = Perda de intensidade sutil
C = Mudança em caráter, porém aceitável	3 = Intensidade mais fraca, porém aceitável
D = Mudança em caráter, amostra inaceitável	4 = Intensidade mais fraca, amostra inaceitável
E = Irreconhecível	5 = Fragrância não detectada

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

“Cultivar o desapego significa sentir-se em definitivo mais cômodo consigo mesmo, tirar o peso de cima e andar mais ligeiro pela vida. Convém renunciar ao que não é nossa autêntica personalidade ou a tantos atos que não nos fazem verdadeiramente felizes.”

(Anônimo)

IV. 1. OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO POR HS-SPME-GC-MS

Visando a otimização da metodologia de extração por HS-SPME, diversos ensaios cromatográficos foram realizados (considerando as condições descritas em III.5.3.), utilizando como amostra pastilhas retiradas da superfície das barras de sabonete recém produzido.

Todos os ensaios foram realizados com extração da amostra no *headspace*, visto que a extração direta, a partir de uma solução de sabonete, poderia causar maior degradação da fibra.

IV. 1. 1. SELEÇÃO DA FIBRA

A seleção da fibra deve considerar as características de polaridade e volatilidade dos analitos de interesse. Entretanto, quando se trata de uma amostra complexa, constituída de vários compostos de diferentes propriedades físicas e químicas, a avaliação de diferentes fibras se faz necessária, visando encontrar a que terá maior afinidade com a maioria dos analitos de interesse.

Para esse trabalho, três fibras disponíveis comercialmente foram avaliadas:

1. PDMS (polidimetilsiloxano)
2. PDMS / DVB (polidimetilsiloxano / divinilbenzeno)
3. DVB / CAR / PDMS (divinilbenzeno / carboxeno / polidimetilsiloxano)

Todos os ensaios foram realizados em condições fixas de quantidade de amostra (200 mg), temperatura (45 °C), tempo de equilíbrio (10 minutos) e tempo de adsorção (10 minutos).

Observando-se as Figuras 7 e 8 verifica-se que a fibra de DVB/CAR/PDMS foi a que apresentou melhor desempenho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

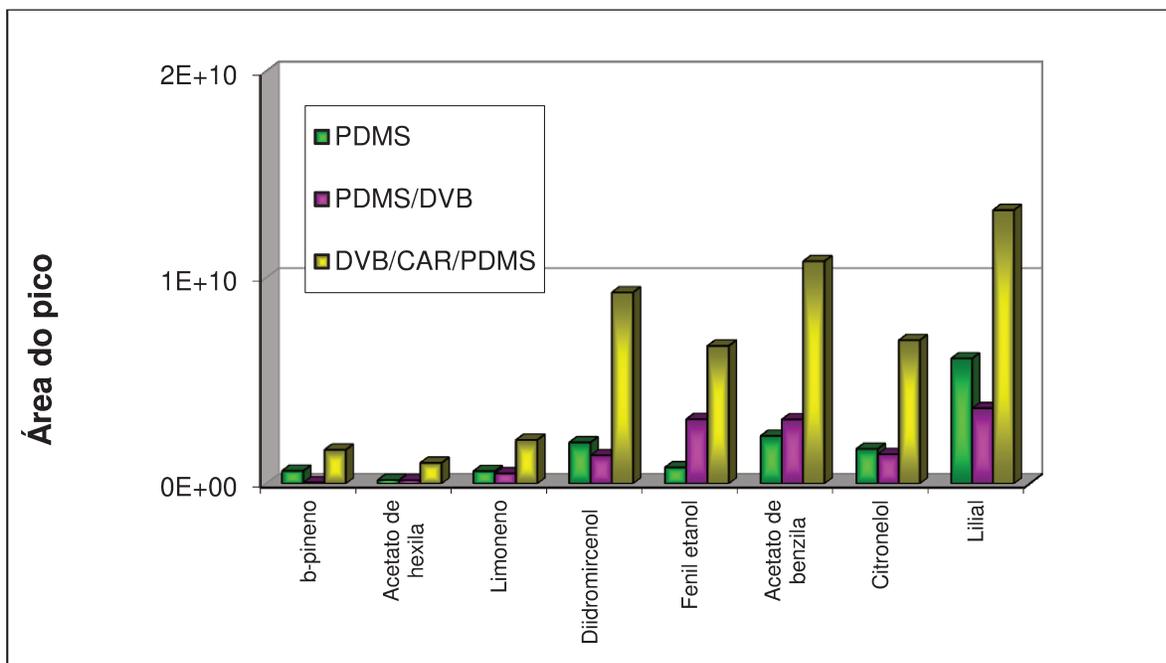


Figura 7. Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para as três fibras testadas: PDMS; PDMS / DVB; DVB / CAR / PDMS

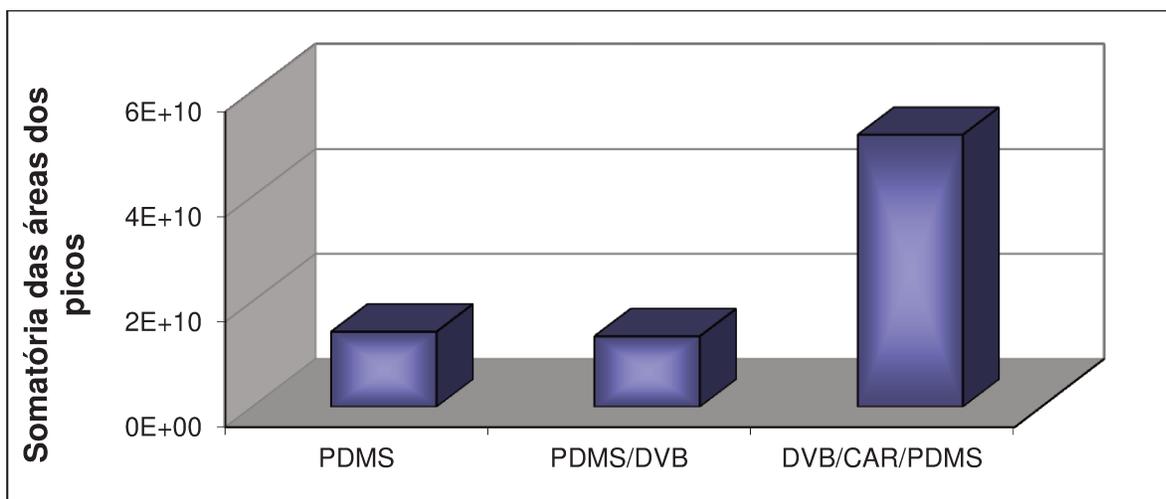


Figura 8. Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para as três fibras testadas: PDMS; PDMS / DVB; DVB / CAR / PDMS.

IV. 1. 2. QUANTIDADE DE AMOSTRA

A quantidade de amostra a ser utilizada na extração por HS-SPME também é um parâmetro extremamente importante, pois tanto os analitos de interesse podem concorrer por sítios ativos da fibra como também pode ocorrer a saturação desta (caso haja grande quantidade de amostra).

Variando-se a altura da pastilha retirada da superfície das barras de sabonete (vide item III.5.3.) e, conseqüentemente, sua massa, testaram-se as seguintes condições: 200, 300, 400 e 500 mg.

Os demais parâmetros de análise foram fixados nas seguintes condições: fibra DVB / CAR / PDMS, temperatura de 45 °C, tempo de equilíbrio de 10 minutos e tempo de adsorção de 10 minutos.

As Figuras 9 e 10 mostram que a massa de 300 mg permitiu boa extração de analitos, semelhante aos resultados observados para as massas de 400 e 500 mg, porém foi selecionada por envolver menor quantidade de material.

Massas superiores a 500 mg não foram avaliadas porque não foi observado aumento das quantidades extraídas para as massas de 400 e 500 mg, quando comparadas à de 300 mg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

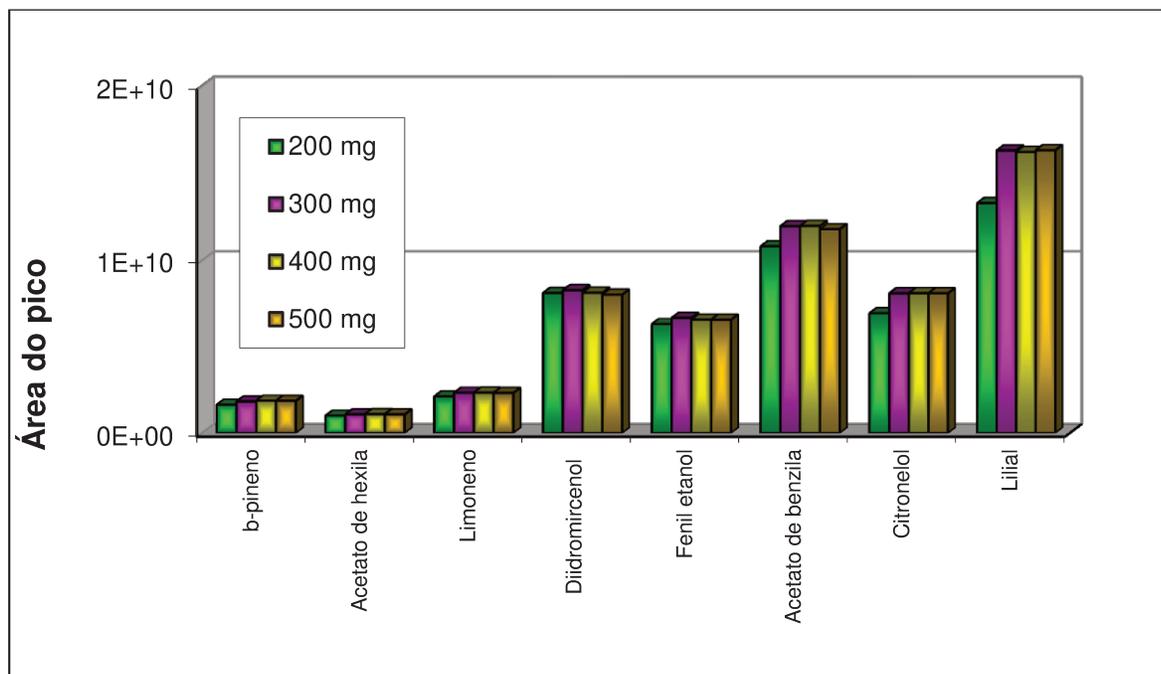


Figura 9. Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para as quatro massas testadas: 200, 300, 400 e 500 mg.

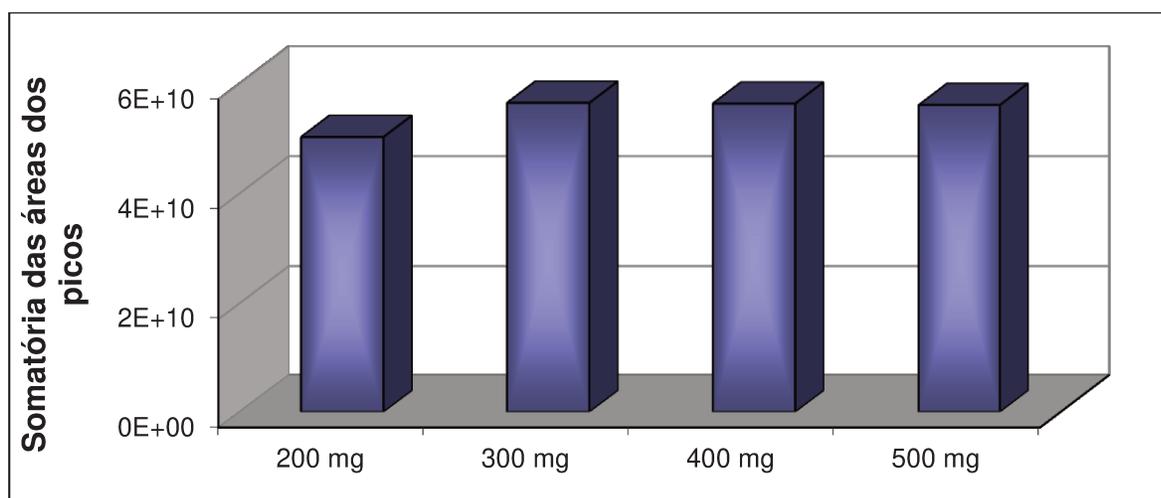


Figura 10. Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para as diferentes massas testadas: 200, 300, 400 e 500 mg.

IV. 1. 3. TEMPERATURA DE PRÉ-EQUILÍBRIO E ADSORÇÃO

A temperatura utilizada durante o pré-equilíbrio e adsorção da amostra também foi variada, de forma a se obter maior eficiência na extração. Foram utilizadas as temperaturas de 35, 45 e 55 °C, mantendo-se fixo os tempos de pré-equilíbrio (10 minutos) e adsorção (10 minutos), assim como a fibra utilizada (DVB / CAR / PDMS) e a quantidade de amostra (200 mg).

Observando-se as Figuras 11 e 12, verifica-se que a temperatura de 45 °C foi a que apresentou melhores resultados na extração, sendo considerada a temperatura ótima para seguimento do trabalho. Ao analisar a Figura 11, observa-se que para alguns compostos a eficiência da extração foi maior a 55 °C, mas para otimização do método se decidiu pela temperatura ótima no resultado geral (Figura 12).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

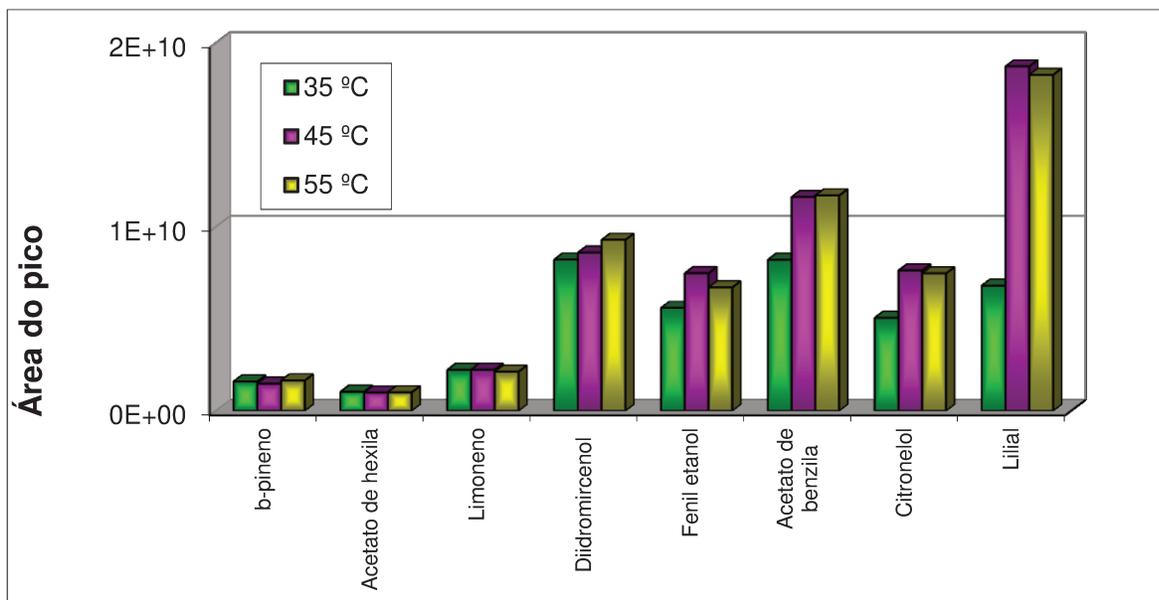


Figura 11. Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para as temperaturas testadas (35, 45 e 55 °C).

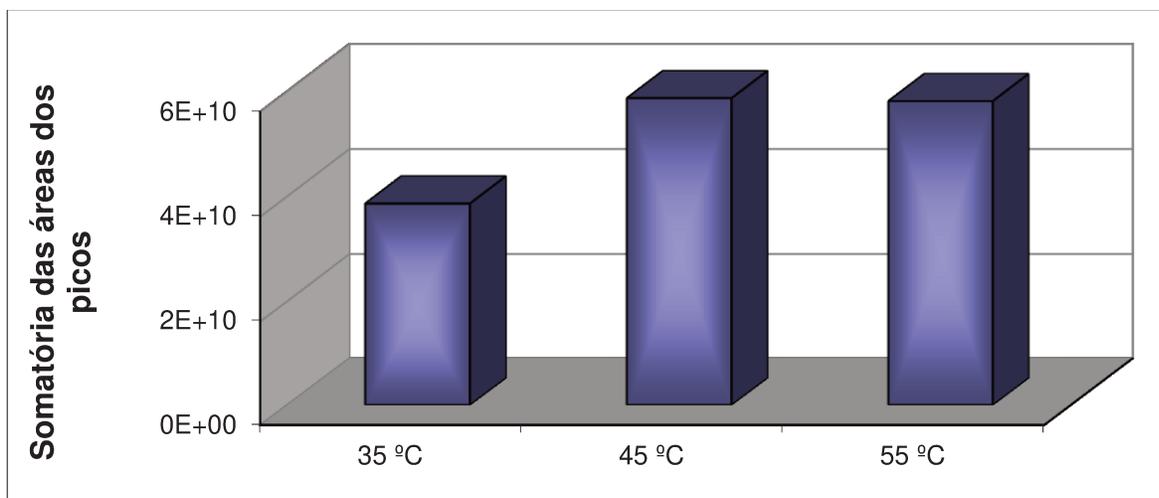


Figura 12. Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para as temperaturas testadas (35, 45 e 55 °C).

IV. 1. 4. TEMPO DE PRÉ-EQUILÍBRIO

O efeito do tempo de pré-equilíbrio de 10, 20 e 40 minutos na extração dos analitos de interesse também foi avaliado. Esse tempo equivale ao período em que o frasco com a amostra permanece em agitação em uma temperatura pré-definida, sem contato com a fibra.

As Figuras 13 e 14 mostram que o tempo de pré-equilíbrio de 20 minutos foi o que apresentou maior impacto positivo no resultado da extração. Testou-se um tempo ainda maior (40 minutos), mas o resultado da extração foi inferior àquele obtido com o uso de 20 minutos.

Todos os demais parâmetros de análise foram mantidos fixos: fibra DVB / CAR / PDMS, 200 mg de amostra, temperatura de 45 °C e 10 minutos de tempo de adsorção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

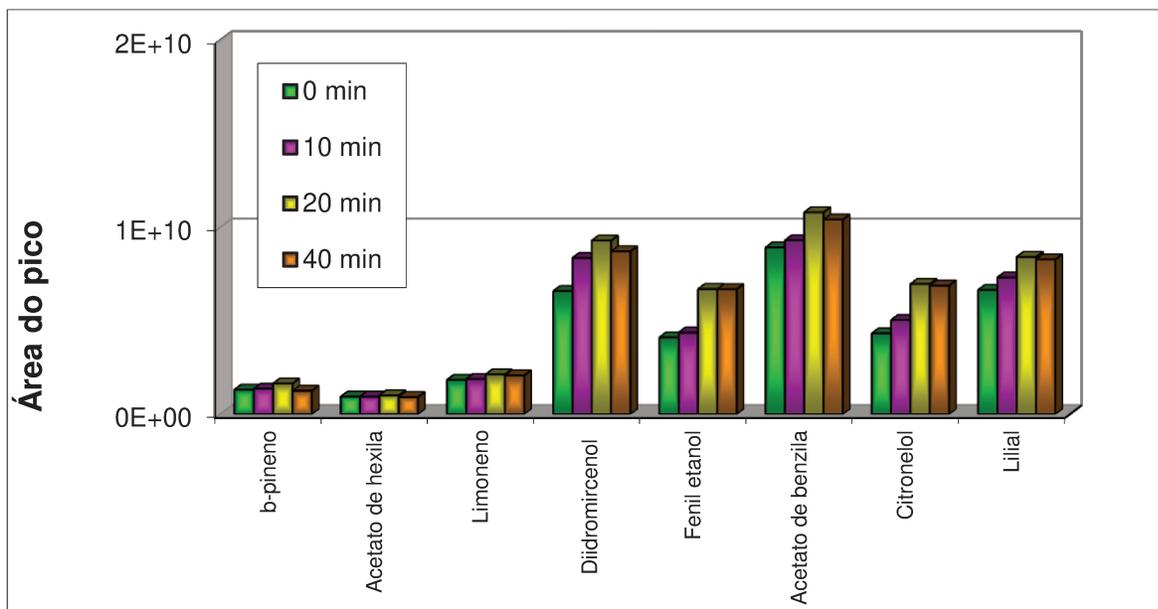


Figura 13. Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para os diferentes tempos de pré-equilíbrio testados (0, 10, 20 e 40 minutos).

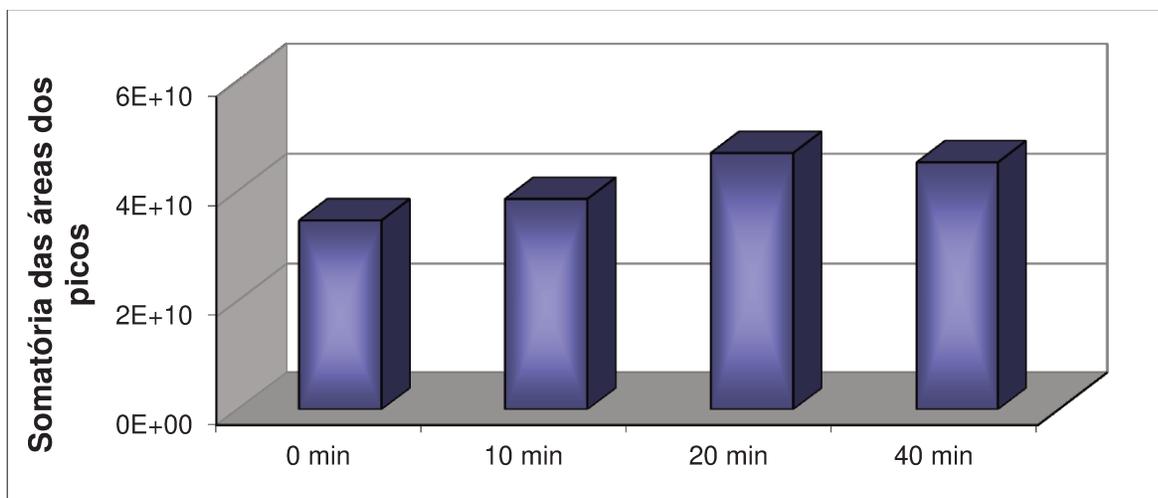


Figura 14. Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para os diferentes tempos de pré-equilíbrio testados (0, 10, 20 e 40 minutos).

IV. 1. 5. TEMPO DE ADSORÇÃO

Finalmente, o efeito do tempo de adsorção dos analitos de interesse foi avaliado e os tempos de 5, 10, 20 e 40 minutos foram testados. Os demais parâmetros de análise utilizados foram: fibra DVB / CAR / PDMS, 200 mg de amostra, temperatura de 45 °C e 10 minutos de tempo de pré-equilíbrio.

Os resultados obtidos, mostrados nas Figuras 15 e 16, apontam que o tempo de 20 minutos foi o que apresentou melhor resultado na extração.

Após a realização de todos os ensaios mencionados acima, definiram-se os seguintes parâmetros otimizados para extração por HS-SPME: fibra DVB / CAR / PDMS, massa da amostra igual a 300 mg, temperatura de 45 °C para pré-equilíbrio e adsorção, 20 minutos de pré-equilíbrio e 20 minutos de adsorção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

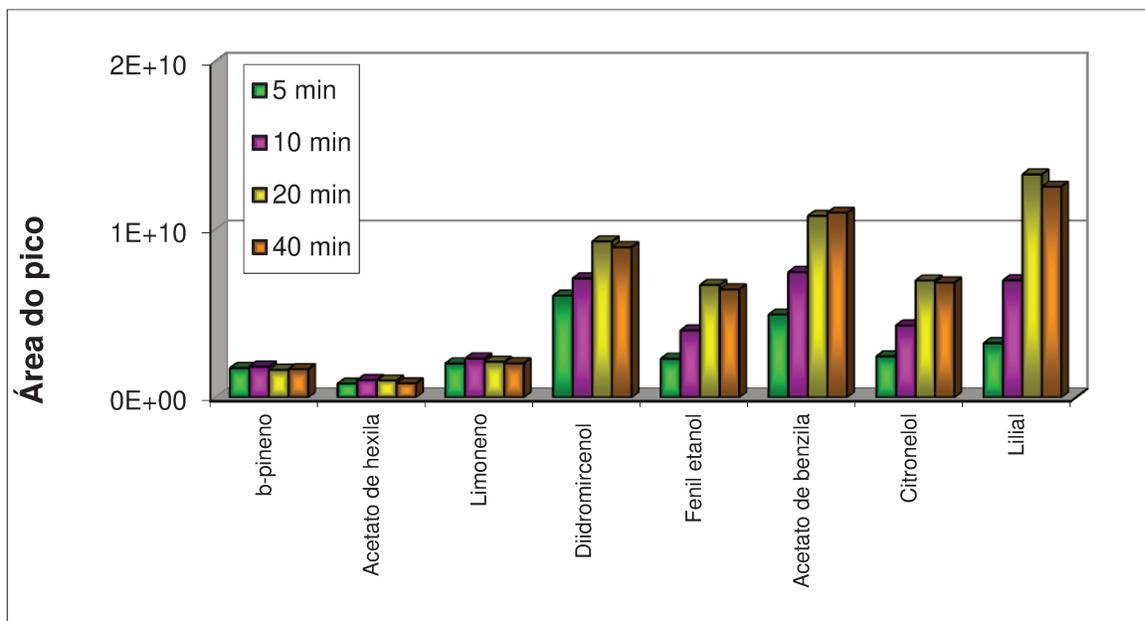


Figura 15. Áreas dos picos cromatográficos de cada componente da fragrância para os diferentes tempos de adsorção testados (5, 10, 20 e 40 minutos).

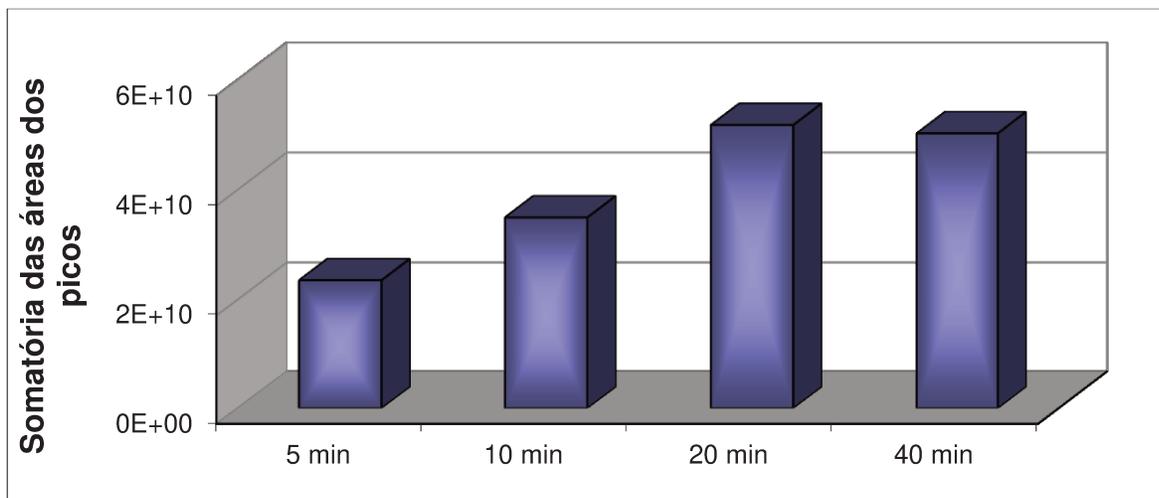


Figura 16. Somatória das áreas dos picos cromatográficos da fragrância para os diferentes tempos de adsorção testados (5, 10, 20 e 40 minutos).

IV. 2. EXCLUSÃO DOS DADOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS ESTOCADAS A 60 °C (HS-SPME-GC-MS)

Uma questão recorrente em estudos de prazo de validade é se as condições aceleradas propostas são realmente uma representação válida da condição ambiente e uma das formas de se avaliar isso é através do gráfico de $\ln k$ versus o inverso da temperatura.

O gráfico mostra as velocidades de reação (Equação 4) calculadas e sua relação com cada uma das temperaturas utilizadas, através da aplicação da lei de Arrhenius (Equação 8). Como o processo de perda de fragrância em sabonete em barra segue essa lei, assim como a maioria das reações que ocorrem em bens de consumo, espera-se continuidade no gráfico mencionado caso os mecanismos dos processos envolvidos sejam os mesmos em todas as temperaturas.

A Figura 17 representa a relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura para todos os dados obtidos por HS-SPME-GC-MS, incluindo a temperatura de 60 °C. Ao analisar o gráfico, verifica-se uma descontinuidade nos resultados obtidos, não sendo possível afirmar que a temperatura de 60 °C seja uma condição acelerada válida para 27 °C.

Após a análise dos dados obtidos por HS-SPME-GC-MS pelo método MASLT e ajuste dos *scores* obtidos (PC1) para a equação $v = \frac{dP}{dt} = \pm kP^n$, verificou-se que as temperaturas de 8, 27, 37 e 45 °C apresentaram mecanismo de perda de fragrância diferente daquele de 60 °C¹⁸, concordando com a descontinuidade observada acima.

¹⁸ No caso de 60 °C o melhor ajustado foi obtido para ordem de reação pseudo-um ($n = 1$), enquanto que para as demais temperaturas foi ordem de reação pseudo-dois (vide item IV. 3, Tabela 6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

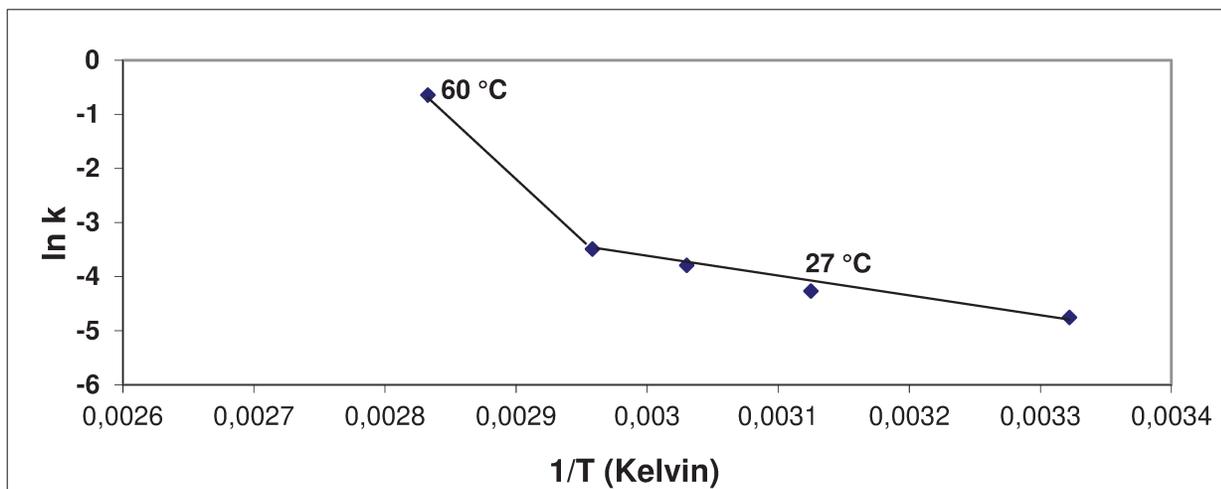


Figura 17. Relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura, através da lei de Arrhenius (HS-SPME-GC-MS) – incluindo os dados de 60 °C.

A Figura 18 mostra uma comparação entre os cromatogramas obtidos para as amostras estocadas a 45 e 60 °C, após 87 dias de estocagem. Ao observar essa figura, verifica-se que o cromatograma obtido para a amostra a 60 °C não apresenta mais os picos de β -pineno, acetato de hexila e lillial, perdidos essas que não ocorreram a 45 °C. Além disso, a Figura 18 também mostra que a possível mudança no mecanismo de perda de fragrância nas amostras estocadas a 60 °C não foi devido a reações químicas de degradação, pois não se observa o surgimento de novos picos, mas sim a ausência de alguns deles, como já mencionado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

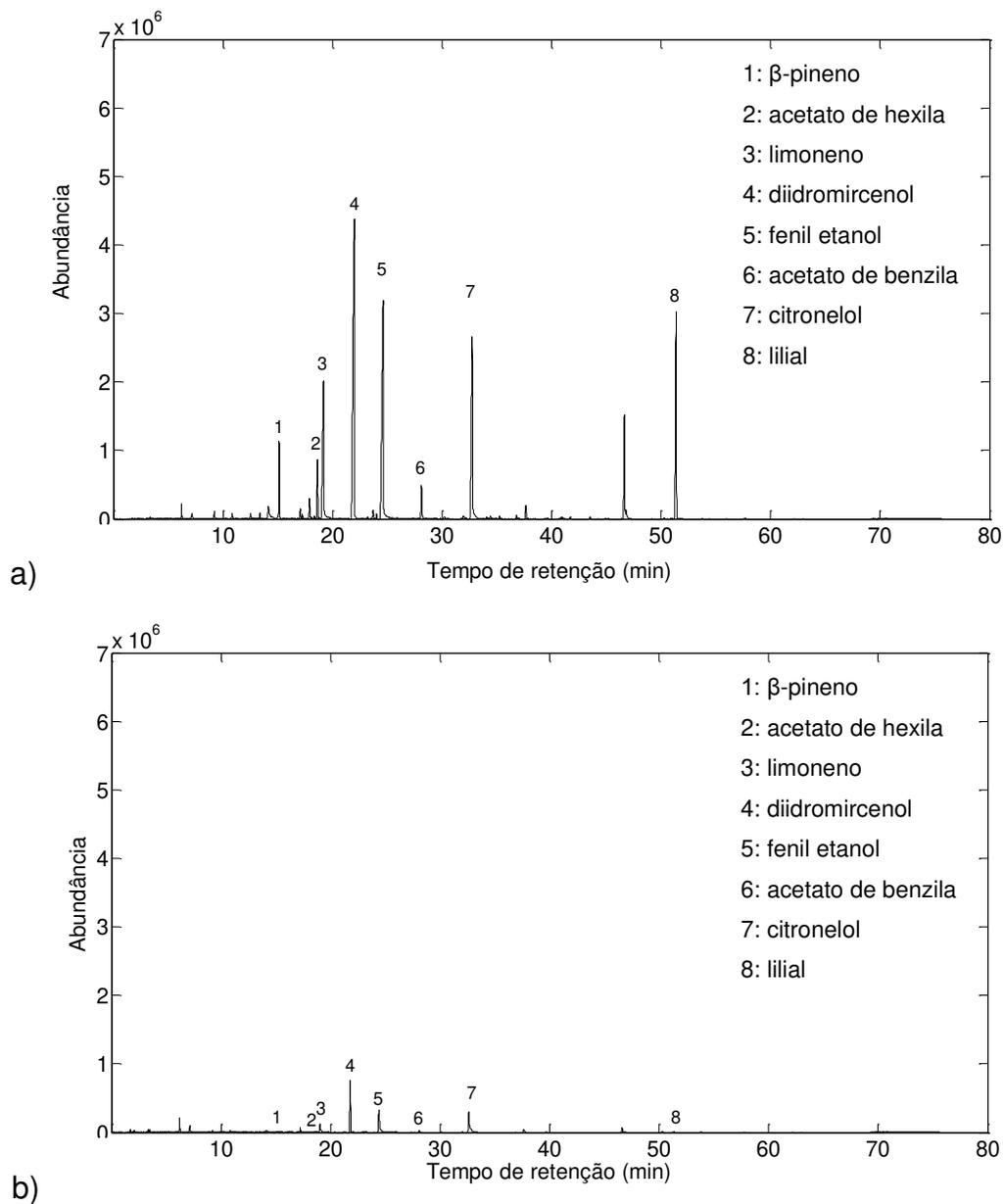


Figura 18. Cromatogramas (HS-SPME-GC-MS) obtidos para as amostras de sabonetes em barra estocadas por 87 dias a **a)** 45 °C e **b)** a 60 °C. Condições cromatográficas: coluna do tipo HP-5MS (5% fenil metil siloxano) 30 m x 0,25 mm x 0,2 μ m, temperatura inicial do forno 40 °C, mantida por 2 minutos, seguida de

RESULTADOS E DISCUSSÃO

aquecimento de 2 °C / minuto até 140 °C e 5 °C / minuto até a temperatura final de 250 °C, mantida por 2 minutos. As temperaturas do injetor, auxiliar e detector foram mantidas a 270 °C, 280 °C e 230 °C, respectivamente. O injetor foi operado no modo splitless. Hélio, grau de pureza 99,9%, fornecido pela Linde Gases Ltda., foi utilizado como gás de arraste com vazão de 0,8 mL/min. O detector de espectrometria de massas foi programado para varrer a faixa de massas de 50 a 550 m/z, utilizando uma fonte de íons de 70 eV. Solvent delay de 0,2 minutos foi utilizado em todas as corridas.

Pela avaliação sensorial realizada pelo painel treinado, as amostras estocadas a 60 °C foram reprovadas após 13 dias de estocagem. Ao analisar o cromatograma obtido (Figura 19. a.) para as amostras estocadas nessas condições (13 dias a 60 °C), verifica-se que todos os picos referentes à fragrância estão presentes, com perfil muito semelhante ao cromatograma obtido para as amostras estocadas por 59 dias a 27 °C (Figura 19. b.), ponto de corte do painel sensorial para essa condição.

Considerando todos os dados acima, pode-se formular a hipótese de que a descontinuidade observada no gráfico da Figura 17 foi uma consequência da frequência de análise inadequada para essa condição de estocagem, ou seja, como essa é uma condição bastante acelerada, o corte pelo painel sensorial ocorreu em poucos dias e a frequência de análises proposta (intervalos de 3 a 5 dias) não foi capaz de capturar todas as informações referentes à perda de fragrância ocorrida nesse período de tempo, interferindo no ajuste do modelo de regressão (Equação 4). Ou seja, a hipótese é de que o mecanismo de perda de fragrância não tenha mudado, mas que a ausência de alguns picos após determinado tempo de estocagem juntamente com o número restrito de dados coletados (poucos pontos de análise) tenham alterado o perfil calculado para a perda de fragrância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

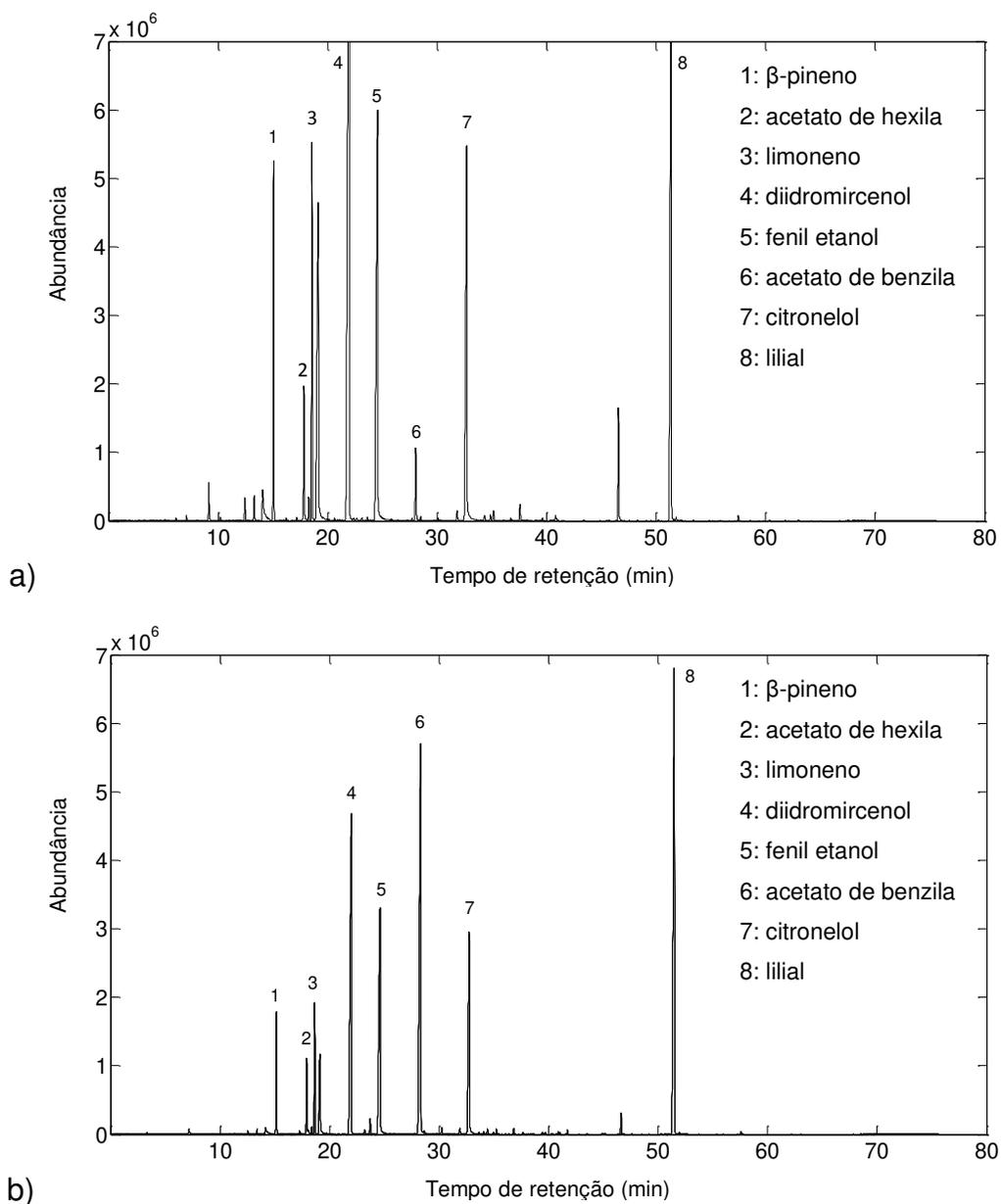


Figura 19. Cromatogramas (HS-SPME-GC-MS) obtidos para as amostras de sabonetes em barra estocadas por **a)** 13 dias a 60 °C e **b)** 59 dias a 27 °C. Condições cromatográficas iguais àsquelas descritas na Figura 18.

No caso desse trabalho, decidiu-se então pela exclusão dos dados obtidos a partir de amostras estocadas a 60 °C para as três técnicas analíticas avaliadas (HS-SPME-GC-MS, Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X e Espectroscopia no Infravermelho Próximo) e, por isso, todas as análises de dados mostradas a seguir (itens IV.3., IV.4. e IV.5.) não apresentarão os dados referentes à essa condição.

IV. 3. ANÁLISE MULTIVARIADA DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA UTILIZANDO HS-SPME-GC-MS

A Figura 20 mostra um cromatograma típico obtido para as amostras de sabonete em barra (estocadas por 3 dias a 27 °C) analisadas por HS-SPME-GC-MS, enquanto que a Figura 21 mostra o cromatograma obtido a partir de uma amostra da fragrância pura (injeção líquida da fragrância em uma solução alcoólica 10%, utilizando as condições cromatográficas descritas em III.5.3.). Ao analisar a Figura 20, observa-se que durante a análise de HS-SPME-GC-MS foram detectados os picos referentes aos oito componentes da fragrância e os tempos de retenção obtidos concordam com aqueles observados para a fragrância pura (Figura 21), mostrando que a técnica de extração e preparação de amostra e os parâmetros experimentais escolhidos foram adequados e permitiram a detecção de todos os analitos de interesse.

Além dos oito picos referentes à fragrância, outros picos menores também foram observados no cromatograma obtido para as amostras (Figura 20) e referem-se à base de sabonete.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

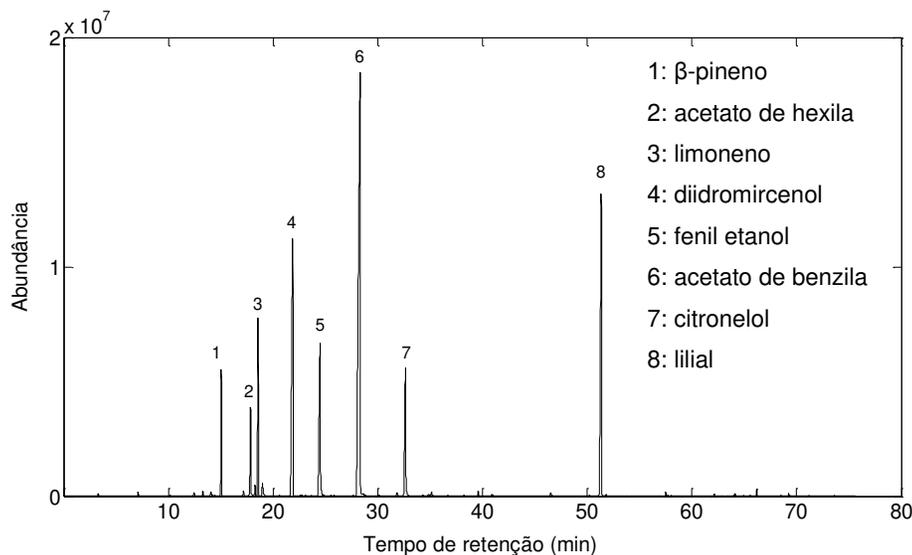


Figura 20. Cromatograma típico (HS-SPME-GC-MS) obtido para amostra de sabonete em barra. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18.

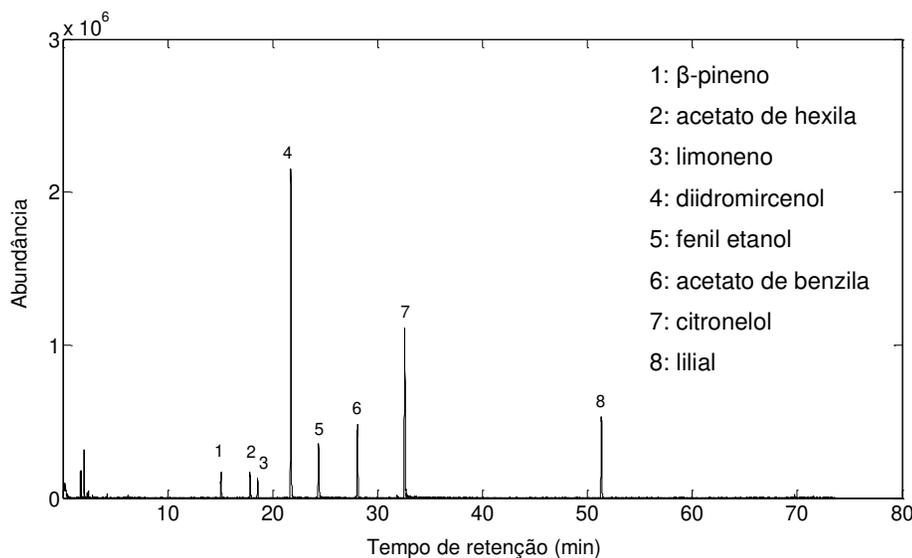


Figura 21. Cromatograma típico (injeção líquida, GC-MS) obtido para amostra da fragrância pura. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como mencionado no Capítulo III, o algoritmo COW (*Correlation Optimized Warping*) foi utilizado para corrigir o alinhamento dos cromatogramas durante a análise multivariada dos dados, evitando o deslocamento de tempo de retenção observado ao compararem-se os cromatogramas obtidos em diferentes datas (Figura 22).

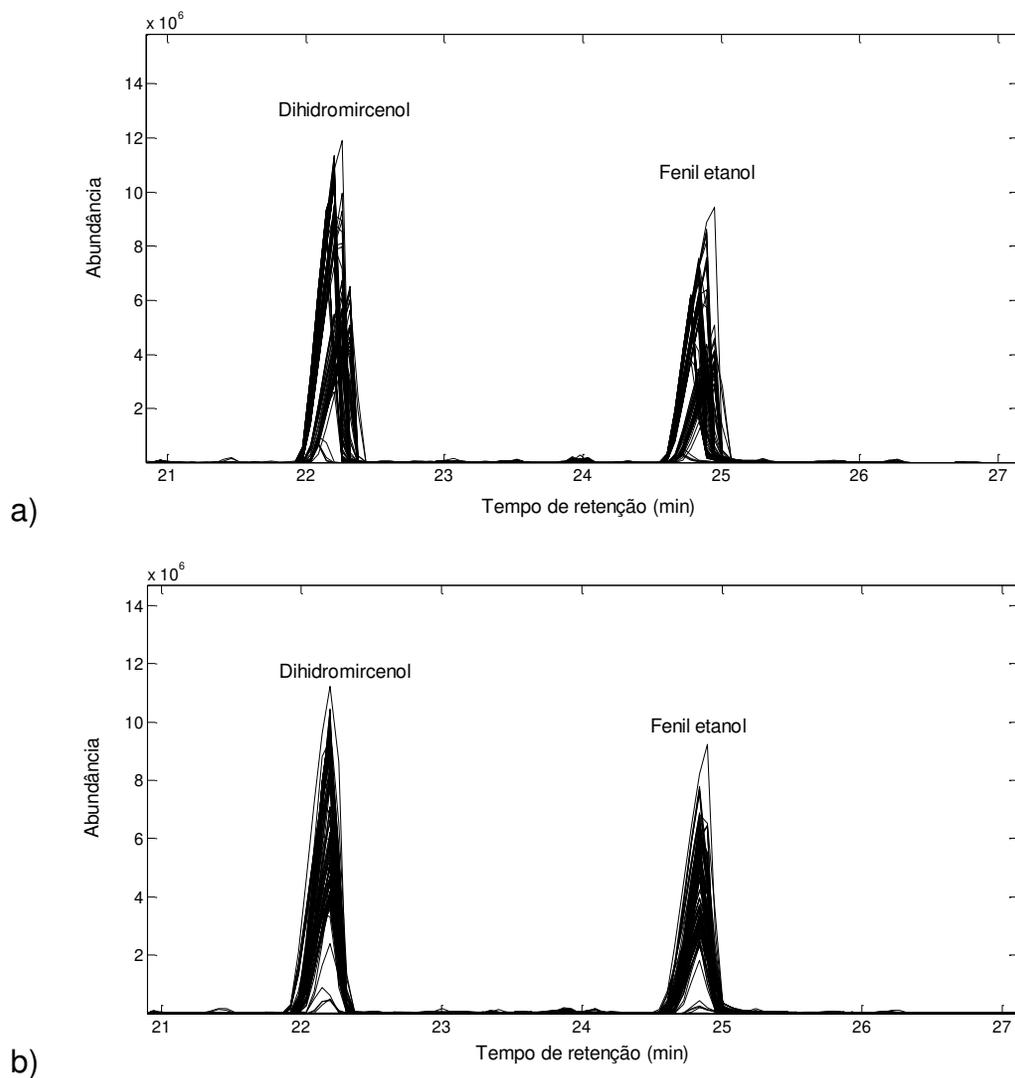


Figura 22. a) Segmento dos cromatogramas originais obtidos para amostra de sabonete em barra; **b)** Mesmo segmento após correção com o algoritmo COW. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando os dados não são previamente tratados com o uso desse algoritmo, a variação gerada pelo deslocamento de tempo de retenção faz com que as primeiras PCs expliquem também variações ocasionadas por esse fenômeno e não tragam somente informações relativas ao tempo de estocagem, impossibilitando a análise correta dos dados.

Após análise dos dados obtidos por HS-SPME-GC-MS, a PCA demonstrou que as primeiras duas PCs explicaram 96% da variância observada (91 e 5%, respectivamente). A Figura 23 mostra os gráficos de *scores* para as primeiras duas PCs (antes da normalização dos dados) e observa-se que os *scores* da PC1 seguem relação temporal sequencial, enquanto que a relação é aleatória no caso da PC2, concordando com as duas premissas principais do método MASLT, ou seja, (i) de que a variação da propriedade de interesse em função do tempo constitui a principal fonte de variação do conjunto de dados e (ii) espera-se que a(s) primeira(s) PC(s) traga(m) informação relativa à degradação do produto, enquanto que as PCs subsequentes devem explicar ruído ou processos não relativos ao tempo.

A Figura 24 apresenta um cromatograma típico obtido (repetição da Figura 20) para as amostras de sabonete em barra, enquanto que a Figura 25 mostra os *loadings* obtidos para a PC1. Ao observar as duas figuras, verifica-se uma grande similaridade entre elas, evidenciando que não houve degradação / reação química da amostra durante o período de estocagem, o que geraria uma variação desproporcional entre os picos e/ou novos picos surgindo ao longo do tempo. Apesar desse ser o comportamento observado na maioria das vezes (ou seja, a perda de fragrância observada nos sabonetes ocorrer devido aos fenômenos físicos de difusão e volatilização, não estando relacionada a nenhum fenômeno de degradação ou a reações químicas), pode haver situações em que ocorra reações de degradação da fragrância, causando alterações qualitativas e quantitativas significativas no perfil cromatográfico observado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

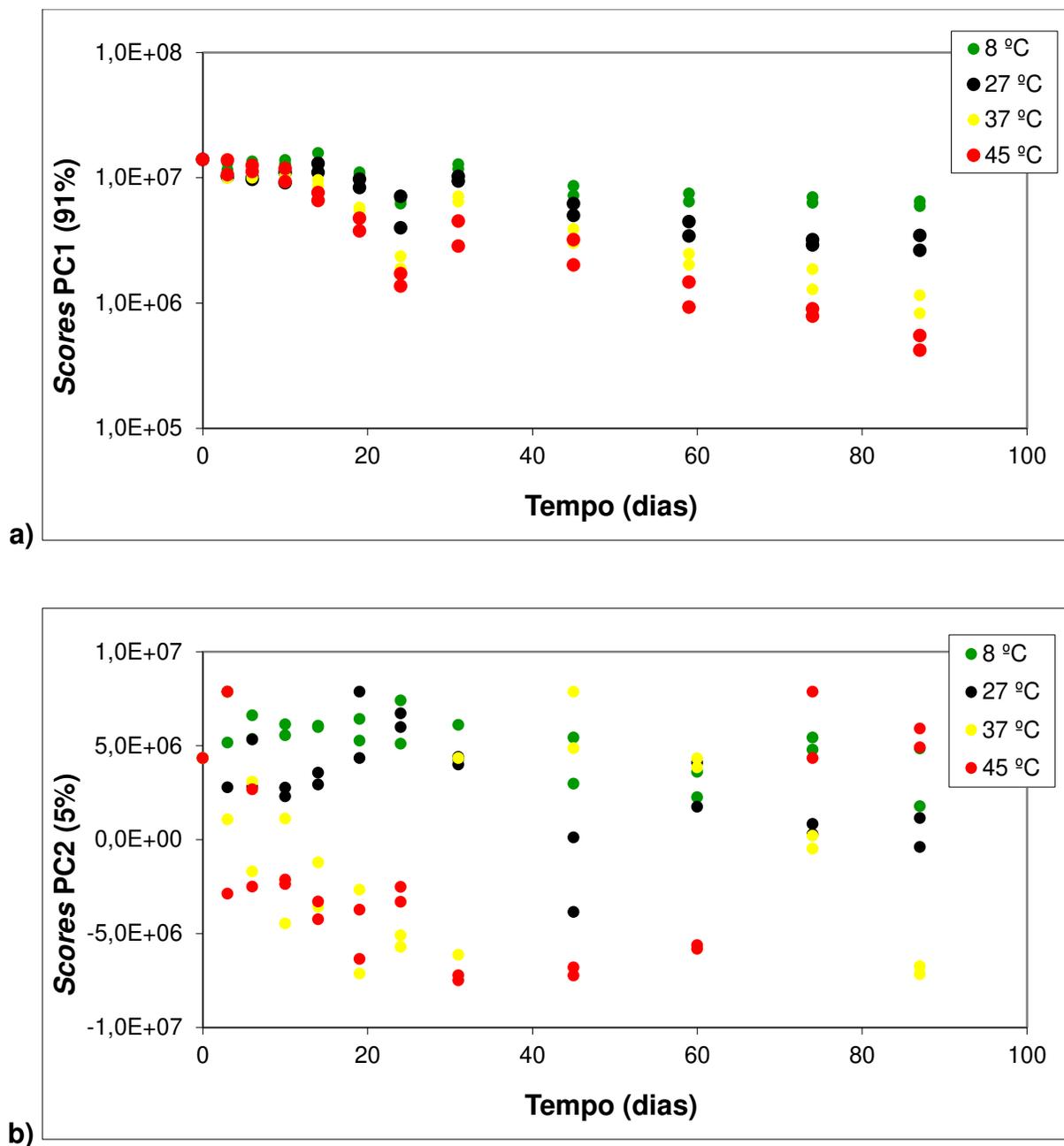


Figura 23. Gráfico dos scores para a) PC1 e b) PC2 (HS-SPME-GC-MS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

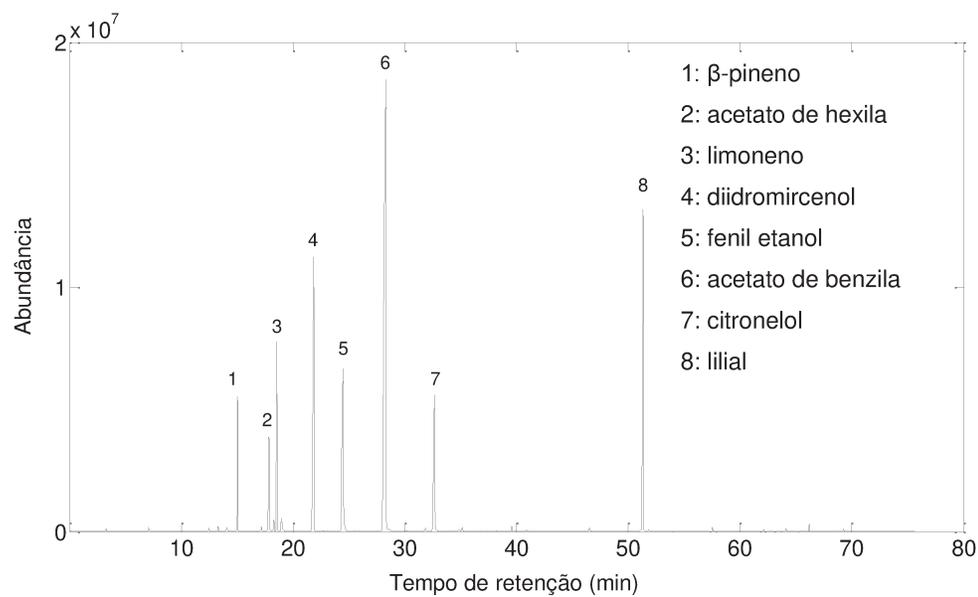


Figura 24. Cromatograma típico (HS-SPME-GC-MS) obtido para amostra de sabonete em barra. Condições cromatográficas iguais àsquelas descritas na Figura 18. Repetição da Figura 20.

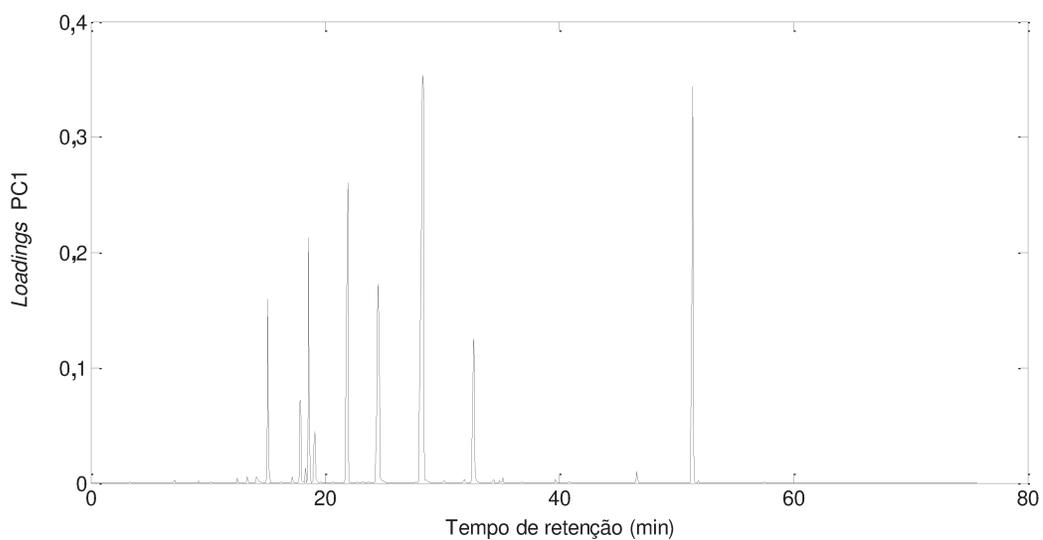


Figura 25. Loadings para PC1 (HS-SPME-GC-MS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *scores* obtidos para PC1 foram ajustados para a equação $v = \frac{dP}{dt} = kP^n$, onde $n = 2$ apresentou o melhor ajuste (Tabela 3). A Figura 26 mostra o ajuste dos *scores* para $n = 2$ e a Figura 27 exibe a relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura, através da lei de Arrhenius.

Tabela 3. Ajuste dos *scores* para PC1 (HS-SPME-GC-MS).

Temperatura (°C)	r^2 para $n = 0$	r^2 para $n = 1$	r^2 para $n = 2$
8	0,8023	0,8263	0,8813
27	0,7679	0,8492	0,8808
37	0,9232	0,9346	0,9646
45	0,8845	0,8950	0,9368

Nota: n = ordem de reação.

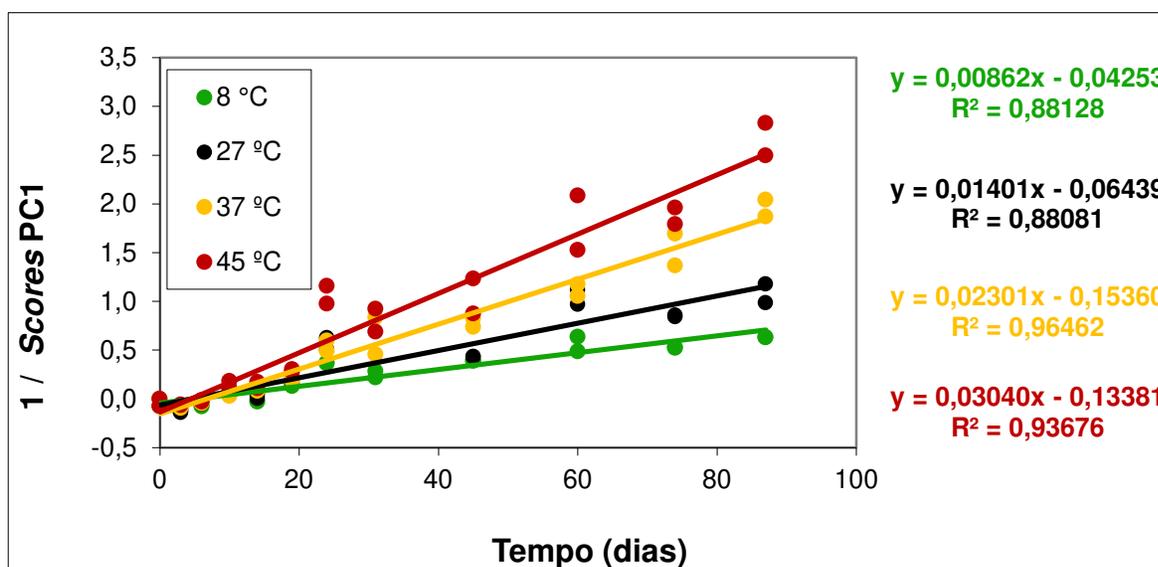


Figura 26. Ajuste dos *scores* para PC1 (HS-SPME-GC-MS).

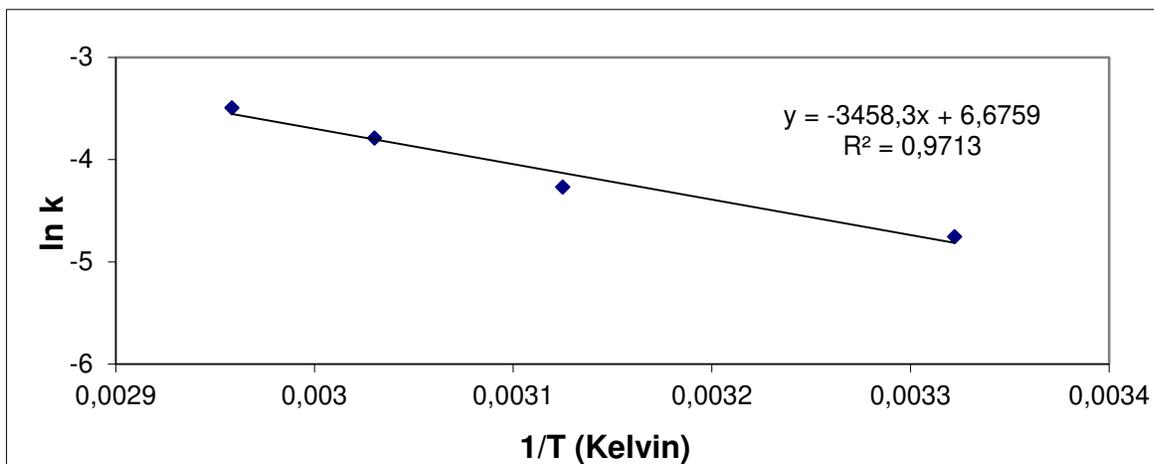


Figura 27. Relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura, através da lei de Arrhenius (HS-SPME-GC-MS).

Ao analisar a Figura 26, observa-se que para a temperatura de 8 °C, usada com o objetivo de impedir a perda de fragrância nas barras e manter amostras comparáveis àquelas recém produzidas (para uso como Padrão durante a avaliação sensorial), também ocorre perda de fragrância em função do tempo, ainda que mais lentamente. Em termos práticos, essas amostras podem ser utilizadas como referência nas avaliações sensoriais sem grandes consequências sobre as conclusões quanto ao prazo de validade do produto, mas novas maneiras de preservação das barras recém produzidas devem ser estudadas.

A partir da Figura 27, calculou-se a energia de ativação (Equação 8) para a perda de fragrância no caso dos dados de HS-SPME-GC-MS e o valor obtido foi 29 ± 8 kJ/mol.

Como já mencionado, o melhor ajuste para a perda da fragrância foi obtido com o uso da equação $v = \frac{dP}{dt} = kP^2$, indicando que a fragrância apresentou uma alta taxa de volatilização nos primeiros dias após produção, estabilizando-se nos dias seguintes de estocagem. Uma explicação para isso é o

RESULTADOS E DISCUSSÃO

fato de que a barra perde água mais rapidamente na superfície, gerando mais formação de fase sólida e transição da fase de cristal líquido do sabonete para uma fase cúbica (no sabonete), reduzindo, dessa maneira, a difusão de componentes na barra. Esse processo ocorre rapidamente em sabonetes recém produzidos e de forma bem mais lenta na maturação do produto, quando as fases mais rígidas mencionadas anteriormente “selam” a barra, reduzindo significativamente as taxas de volatilização [2].

A Tabela 4 mostra um comparativo para perda de água no interior da barra e na superfície dela, evidenciando que a perda na superfície foi muito mais rápida que a que ocorreu no interior da barra, independente da temperatura de estocagem, sendo, na média, aproximadamente 32% maior.

Para verificar se a perda de fragrância também foi maior na superfície da barra que no interior dela, todas as análises (no caso de HS-SPME-GC-MS) que foram realizadas com pastilhas retiradas da superfície foram também realizadas com pastilhas do interior da barra. A partir dos dados obtidos, as constantes de velocidade (k) para a perda de fragrância no interior da barra foram calculadas, utilizando a Equação 4 e $n = 2$ (melhor ajuste também para esse caso). A Tabela 5 compara essas constantes obtidas com aquelas calculadas previamente (para superfície da barra) e verifica-se que também a perda de fragrância foi mais rápida na superfície do sabonete.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4 Comparação entre perda de água (em massa) no interior (meio) e na superfície da barra (sup.).

Tempo (dias)	8 °C		27 °C		37 °C		45 °C	
	– Meio	– Sup.						
0	13,11	13,02	13,11	13,02	13,11	13,02	13,11	13,02
3	13,14	12,82	13,79	12,78	12,58	11,38	12,25	10,73
6	13,49	13,10	12,73	12,61	13,01	10,32	11,90	10,24
10	12,68	11,20	11,56	11,45	11,35	10,00	11,13	9,90
14	12,87	12,40	12,25	11,63	11,98	9,44	11,14	9,34
19	12,58	12,07	12,55	11,55	10,79	9,36	10,28	9,02
24	13,08	11,73	12,24	10,80	9,86	8,60	9,10	8,15
31	11,90	10,72	10,74	9,56	9,41	8,16	9,56	7,80
45	11,23	9,93	10,67	9,11	8,98	7,03	9,04	7,21
59	10,89	9,06	9,45	8,34	8,65	7,15	8,36	6,37
74	10,57	8,15	8,54	6,59	8,34	6,95	7,85	5,45
87	10,03	7,27	8,57	7,34	7,26	6,28	7,97	5,50
Perda Total (%)	23	44	35	44	45	52	39	58

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5. Comparação entre a velocidade (k) calculada para perda de fragrância no interior e na superfície da barra (HS-SPME-GC-MS).

Técnica analítica: HS-SPME-GC-MS		
T (°C)	k – interior da barra ($P^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) n = 2	k – superfície da barra ($P^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) n = 2
8	0,0030 ± 0,0003	0,0086 ± 0,0007
27	0,0049 ± 0,0004	0,014 ± 0,001
37	0,0140 ± 0,0005	0,023 ± 0,001
45	0,022 ± 0,001	0,030 ± 0,002

Nota: n = ordem de reação.

Finalmente, para se calcular o prazo de validade do sabonete o valor crítico da propriedade de interesse (ou *score* crítico) deve ser definido. Nos estudos nos quais a fragrância é o atributo principal envolvido, geralmente o ponto de corte é definido através das avaliações sensoriais realizadas por *experts* ou painéis treinados. Uma vez que uma amostra inaceitável é identificada, seu prazo de validade é determinado como o ponto de corte para aquela condição de estocagem e o valor crítico da propriedade de interesse é calculado através da sua projeção nos *scores*.

Para o caso da fragrância estudada, os prazos de validades (ou pontos de corte) determinados pelo painel sensorial para as temperaturas de 37 e 45 °C foram de 45 e 31 dias, respectivamente.

Utilizando a Equação 4 e sua respectiva solução para $n = 2$ (Tabela 3), os valores de k foram usados para calcular o prazo de validade do sabonete em barra a 27 °C, empregando os valores iniciais, P_0 , e os valores críticos, P_t , da propriedade de interesse para as temperaturas de 37 e 45 °C, conforme mostrado na Tabela 6.

Analisando os dados mostrados na Tabela 6, verifica-se que o prazo de validade calculado para 27 °C foi de 59 ± 5 dias, usando o corte sensorial de 37

RESULTADOS E DISCUSSÃO

°C, ou 60 ± 5 dias, usando os dados de $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Ambos os prazos de validade calculados estão de acordo com o determinado sensorialmente para essa temperatura ($27 \text{ }^\circ\text{C}$), que foi 59 ± 7 dias, mostrando que foi possível o uso de dados instrumentais para o cálculo do prazo de validade desse produto, bem como o uso temperaturas mais altas para aceleração da perda de fragrância em sabonetes.

Tabela 6. Cálculo do prazo de validade para $27 \text{ }^\circ\text{C}$ usando os dados obtidos a 37 e $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (HS-SPME-GC-MS).

<i>Técnica analítica: HS-SPME-GC-MS</i>				
T (°C)	k ($P^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) $n = 2$	P_t^a	P_0	Prazo de validade a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ – calculado ^b (dias)
8	$0,0086 \pm 0,0007$			
27	$0,014 \pm 0,001$			
37	$0,023 \pm 0,001$	0,745	1,914	59 ± 5
45	$0,030 \pm 0,002$	0,737	1,914	60 ± 5

Nota: n = ordem de reação.

^a Os prazos de validade determinados pelo painel sensorial para as temperaturas de 37 e $45 \text{ }^\circ\text{C}$ foram 45 e 31 dias, respectivamente.

^b Utilizando a equação $\frac{1}{P_t} - \frac{1}{P_0} = kt$ e os valores de P_t , P_0 e $k_{27^\circ\text{C}}$ mostrados na Tabela 6.

Através do uso de temperaturas mais altas para aceleração do estudo de prazo de validade do produto, verificou-se que o estudo realizado durante 59 dias em condição ambiente pôde ser concluído em 45 dias no caso de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e em 31 dias para a condição de $45 \text{ }^\circ\text{C}$, ou seja, metade do tempo real nesse último caso. Apesar de representar uma grande vantagem para o método proposto, esses dados evidenciam dois problemas existentes nos protocolos atuais utilizados para esses estudos:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 90 dias a 45 °C não irá corresponder a 24 meses a temperatura ambiente, correlação considerada como uma regra na indústria de sabonetes. Se considerar a fragrância utilizada nesse trabalho, por exemplo, as amostras deveriam suportar 12 meses a 45 °C para a comprovação do prazo de validade de 24 meses a temperatura ambiente. Em termos práticos, isso significa que diversas barras de sabonete comercializadas com prazo de validade de 24 meses possivelmente não mantêm suas propriedades (intensidade e característica de fragrância, no caso) durante todo esse período;

- os comportamentos de diferentes fragrâncias e formulações de sabonetes não são sempre os mesmos e, por isso, a correlação entre diferentes temperaturas deve ser determinada para cada caso.

Vale comentar que a fragrância utilizada neste trabalho foi um protótipo modelo, constituído a partir de um número muito pequeno de compostos químicos, os quais foram escolhidos de maneira a produzir uma fragrância bem mais volátil que aquelas usadas comercialmente. Esse procedimento visou acelerar a execução do estudo, uma vez que sabonetes em barra geralmente possuem prazo de validade em torno de 24 meses.

Entretanto, sabonetes em barra disponíveis no mercado também foram analisados e os resultados obtidos (Tabela 7) comprovaram que foi possível o uso de dados instrumentais para o cálculo do prazo de validade desse produto, bem como o uso de temperaturas mais altas para aceleração da perda de fragrância. Além disso, os dados das amostras comerciais mostraram que alguns produtos de mercado possuem prazo de validade menor que o determinado na embalagem (24 meses), confirmando que 90 dias a 45 °C não irá necessariamente corresponder a 24 meses a temperatura ambiente (Tabela 7).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 7. Cálculo do prazo de validade para sabonetes em barra disponíveis no mercado¹⁹.

Produto de Mercado A		
T (°C)	k ($P^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) n = 2	Prazo de validade a 27 °C – calculado ^b (meses)
8	0,00000000011	
27	0,00000000062	
37	0,00000000489	8 ± 4
45	0,00000000523	9 ± 5

Produto de Mercado B		
T (°C)	k ($P^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) n = 2	Prazo de validade a 27 °C – calculado ^b (meses)
8	0,0000012	
27	0,0000043	
37	0,0000160	9 ± 2
45	0,0000250	13 ± 2

Produto de Mercado C		
T (°C)	k ($P^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) n = 2	Prazo de validade a 27 °C – calculado ^b (meses)
8	0,0065	
27	0,0139	
37	0,0207	22 ± 3
45	0,0300	20 ± 4

Nota: n = ordem de reação.

^b O prazo de validade declarado na embalagem do produto foi de 24 meses.

¹⁹ As amostras de mercado foram analisadas usando o procedimento experimental descrito em III. 5. 3, com pastilhas retiradas da superfície das barras.

IV. 3. 1. RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DA BARRA INTEIRA

Para avaliar o método de amostragem utilizado, ou seja, pastilhas retiradas da superfície das barras de sabonete, análises da barra de sabonete inteira por HS-SPME-GC-MS também foram realizadas.

A Figura 28 mostra um cromatograma típico (repetição da Figura 20) obtido para as pastilhas e a Figura 29 mostra um cromatograma obtido a partir da análise da barra inteira. Ao analisar as duas figuras, observa-se que os cromatogramas são muito semelhantes em perfis, evidenciando que a técnica de amostragem proposta (pastilha) é uma representação válida da barra de sabonete, sendo, portanto, adequada para comparação com os resultados oriundos do painel sensorial (que também avaliam a barra inteira).

Para alguns compostos, a intensidade observada no caso da análise da barra inteira (Figura 29) foi maior que a encontrada no caso da pastilha (Figura 28), como esperado uma vez que a comparação envolve amostras com massa e área superficial muito distintas e consideravelmente maiores no caso da barra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

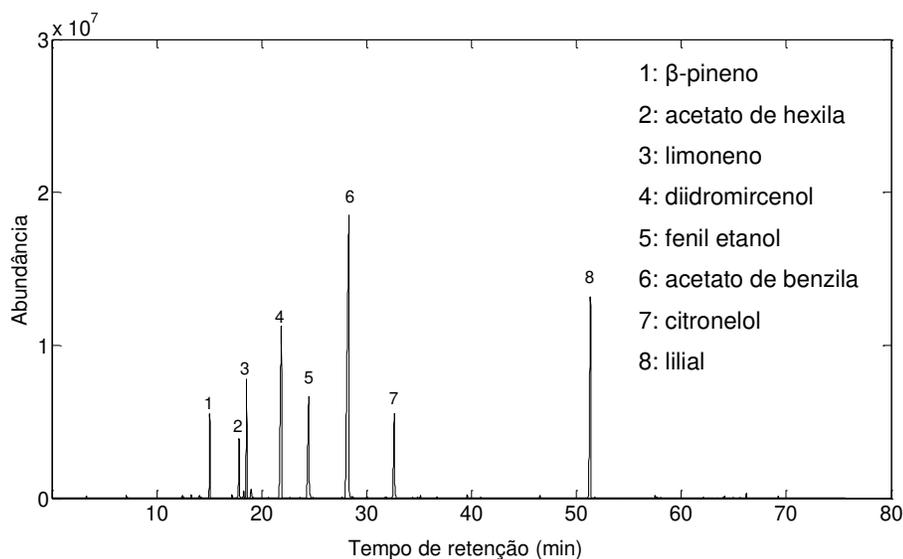


Figura 28. Cromatograma típico (HS-SPME-GC-MS) obtido para as pastilhas. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18. Repetição da Figura 20.

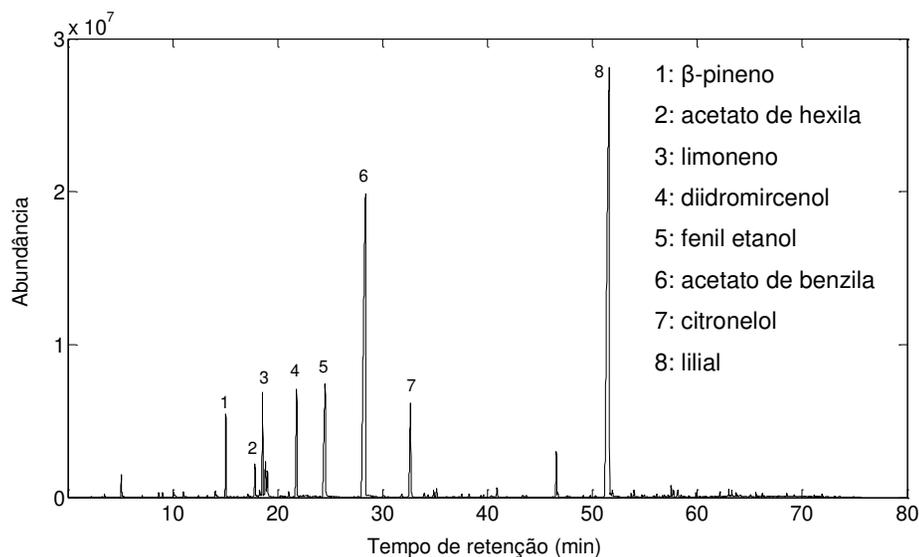


Figura 29. Cromatograma típico (HS-SPME-GC-MS) obtido para análise da barra inteira. Condições cromatográficas iguais àquelas descritas na Figura 18.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas obtidos a partir da análise da barra inteira foram tratados seguindo o mesmo procedimento usado para os dados das pastilhas. Após a PCA, o melhor ajuste dos *scores* pela Equação 4 foi obtido com $n = 2$, concordando com o resultado mostrado anteriormente para a análise das pastilhas.

A Tabela 8 compara as constantes de velocidade calculadas a partir dos dados obtidos com a análise das pastilhas e da barra inteira. As constantes de velocidade calculadas para a barra inteira concordam com as da pastilha (exceto para 8 °C), confirmando novamente a validade da técnica de amostragem proposta nesse trabalho.

Tabela 8. Comparação entre a velocidade (k) calculada para perda de fragrância a partir da análise da barra inteira e de pastilha (HS-SPME-GC-MS).

Técnica analítica: HS-SPME-GC-MS		
T (°C)	k – barra inteira ($P^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) n = 2	k – pastilhas ($P^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) n = 2
8	0,0054 ± 0,0001	0,0086 ± 0,0007
27	0,0133 ± 0,0004	0,014 ± 0,001
37	0,0221 ± 0,0007	0,023 ± 0,001
45	0,031 ± 0,001	0,030 ± 0,002

Nota: n = ordem de reação.

O prazo de validade do produto foi novamente calculado, dessa vez utilizando os dados da análise da barra inteira (Tabela 9). Os resultados obtidos concordam com aqueles calculados a partir das pastilhas retiradas da superfície (Tabela 6) e também com o determinado sensorialmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 9. Cálculo do prazo de validade para 27 °C usando os dados obtidos a 37 e 45 °C (HS-SPME-GC-MS, barra inteira).

<i>Técnica analítica: HS-SPME-GC-MS</i>				
T (°C)	k ($P^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) n = 2	P_t^a	P_0	Prazo de validade a 27 °C – calculado ^b (dias)
8	0,0054 ± 0,0001			
27	0,0133 ± 0,0004			
37	0,0221 ± 0,0007	0,769	1,982	60 ± 2
45	0,031 ± 0,001	0,774	1,982	59 ± 2

Nota: n = ordem de reação.

^a Os prazos de validade determinados pelo painel sensorial para as temperaturas de 37 e 45 °C foram 45 e 31 dias, respectivamente.

^b Utilizando a equação $\frac{1}{P_t} - \frac{1}{P_0} = kt$ e os valores de P_t , P_0 e $k_{27^\circ\text{C}}$ mostrados na Tabela 9.

IV. 3. 2. ANÁLISE UNIVARIADA DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA UTILIZANDO HS-SPME-GC-MS

Uma das maneiras convencionais de se analisar a variação de uma dada propriedade com relação ao tempo é a análise univariada de um ou mais parâmetros relacionados.

No caso da análise de perda de fragrância, a análise univariada avalia a variação de apenas um ou alguns de seus compostos, e não a variação da fragrância como um todo. Ou seja, o composto ou alguns compostos considerados mais importantes para a composição da fragrância são avaliados individualmente, e a variação encontrada é considerada representativa da variação do todo. Apesar de limitado, esse método ainda é bastante utilizado na indústria, gerando muitas discussões quanto a definição de quais são os compostos mais importantes para cada fragrância e quais devem ser avaliados para a determinação do prazo de validade do produto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 10 mostra os parâmetros cinéticos calculados através da análise univariada dos dados obtidos por HS-SPME-GC-MS para cada um dos oito compostos constituintes da fragrância. Utilizando a Equação 4, os dados referentes a quatro dos oito compostos apresentaram melhor ajuste para $n = 1$, enquanto que nos demais casos o melhor ajuste foi obtido com $n = 2$. A Equação 8 foi utilizada para cálculo da energia de ativação e os valores calculados são também mostrados na Tabela 9.

Apesar da informação mostrada na Tabela 9 ser de grande valia para o entendimento da perda de cada um componentes da fragrância com relação ao tempo, os resultados da análise univariada são inadequados para determinação do prazo de validade do produto, visto que os processos de difusão e volatilização envolvidos na perda de cada um dos compostos apresentaram velocidades bastante distintas. Ao analisar os dados da Tabela 10, verifica-se que o prazo de validade calculado para o produto a partir da análise univariada varia de 16 (fenil etanol) a 128 dias (diidromircenol), dependendo do composto avaliado, enquanto que o determinado sensorialmente foi de 59 ± 7 dias.

Outro dado bastante importante é o fato do ponto de corte determinado sensorialmente avaliar o todo, e não somente um ou alguns compostos individualmente, além de ser baseado na proporção relativa dos compostos no *headspace* da amostra. Essa é outra grande vantagem do método multivariado proposto, pois ele leva em consideração todos esses aspectos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 10. Parâmetros calculados para perda de fragrância em sabonetes em barra através de análise univariada (HS-SPME-GC-MS).

Composto / Ordem de reação	Prazo de validade a 27 °C, calculado (dias) ¹	k, 8 °C ²	k, 27 °C ²	k, 37 °C ²	k, 45 °C ²	Ea (kJ/mol)
Acetato de hexila / 1	50 ± 5	1,3 x 10 ⁻²	1,8 x 10 ⁻²	2,0 x 10 ⁻²	2,9 x 10 ⁻²	15 ± 4
Acetato de benzila / 1	77 ± 5	1,2 x 10 ⁻²	2,0 x 10 ⁻²	3,1 x 10 ⁻²	5,0 x 10 ⁻²	31 ± 5
Citronelol / 2	51 ± 5	2,1 x 10 ⁻¹⁰	2,8 x 10 ⁻¹⁰	3,1 x 10 ⁻¹⁰	4,6 x 10 ⁻¹⁰	16 ± 4
Diidromircenol / 2	128 ± 6	3,6 x 10 ⁻¹⁰	2,7 x 10 ⁻¹⁰	1,8 x 10 ⁻⁹	1,6 x 10 ⁻⁹	40 ± 24
Fenil etanol / 2	16 ± 4	3,0 x 10 ⁻¹⁰	3,2 x 10 ⁻¹⁰	3,3 x 10 ⁻¹⁰	4,9 x 10 ⁻¹⁰	9 ± 5
Lilial / 1	98 ± 6	5,7 x 10 ⁻³	7,9 x 10 ⁻³	1,1 x 10 ⁻²	1,8 x 10 ⁻²	25 ± 6
Limoneno / 1	45 ± 5	9,6 x 10 ⁻³	1,8 x 10 ⁻²	2,2 x 10 ⁻²	2,6 x 10 ⁻²	23 ± 2
B-pineno / 2	63 ± 5	8,6 x 10 ⁻¹⁰	1,7 x 10 ⁻⁹	2,4 x 10 ⁻⁹	2,8 x 10 ⁻⁹	28 ± 1

Notas:

¹ Utilizando os resultados sensoriais para as amostras estocadas a 37 °C.

² Constantes de velocidade expressas em:

- (i) dias⁻¹ para n = 1;
- (ii) P⁻¹.dia⁻¹ para n = 2.

IV. 4. ANÁLISE MULTIVARIADA DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Outra possibilidade investigada foi o uso da técnica analítica de Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X para análise de perda de fragrância em sabonete em barra, visto que seu uso ofereceria algumas vantagens quando comparado ao uso de HS-SPME-GC-MS, tais como: maior rapidez na análise, a não necessidade de preparação da amostra e/ou extração da fragrância e facilidade de operação do equipamento.

A Figura 30 mostra um espectro típico obtido para as amostras de sabonete em barra (estocadas por 3 dias a 27 °C) analisadas por Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X. Observa-se que o espectro obtido é dominado pelos picos referentes ao espalhamento da fonte de raios-X (constituída de ródio), não apresentando qualquer outro pico além desses. Tal comportamento já era esperado, uma vez que as amostras analisadas eram constituídas por compostos orgânicos.

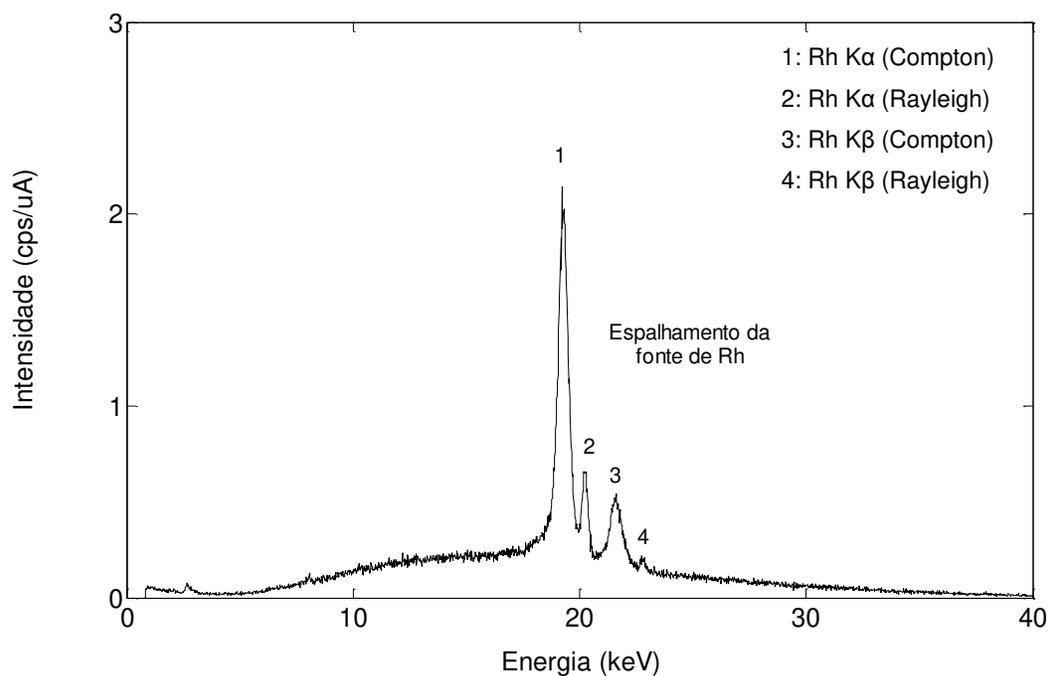


Figura 30. Espectro típico obtido por Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X para uma amostra de sabonete em barra.

Após análise dos espectros obtidos, a PCA demonstrou que as primeiras duas PCs explicaram 98% da variância observada (86 e 12%, respectivamente).

A Figura 31 mostra os *scores* obtidos para PC1 e verifica-se que eles não seguem uma relação temporal sequencial, variando aleatoriamente. Os *scores* obtidos para PC2, por outro lado, apresentaram variação temporal sequencial e são apresentados na Figura 32. Os *loadings* para PC1 e PC2 são mostrados na Figura 33.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

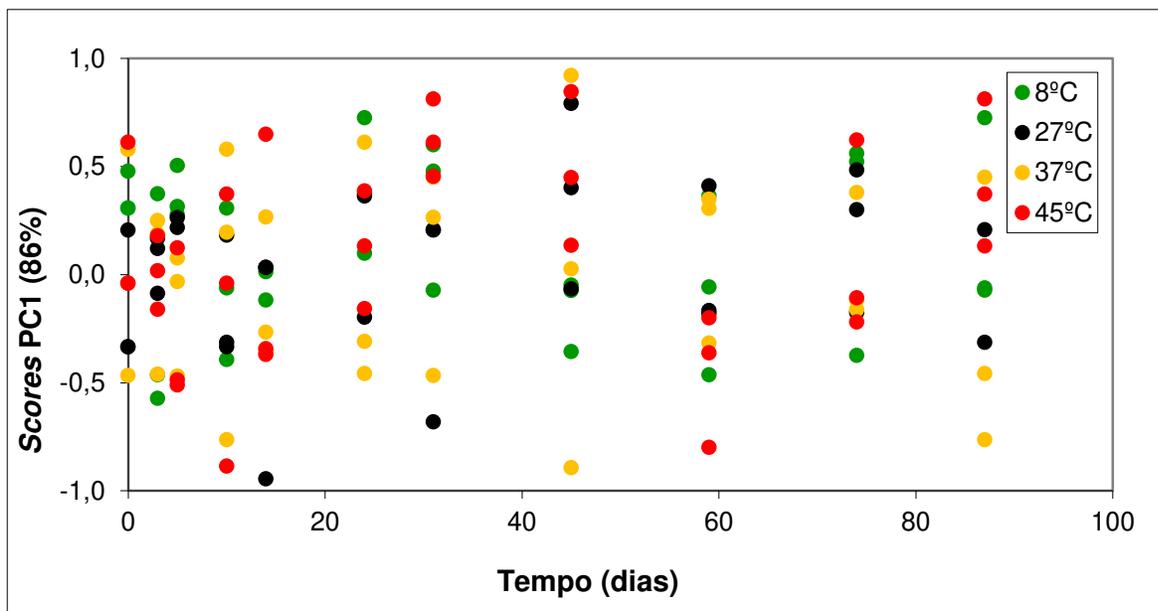


Figura 31. Scores para PC1 (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).

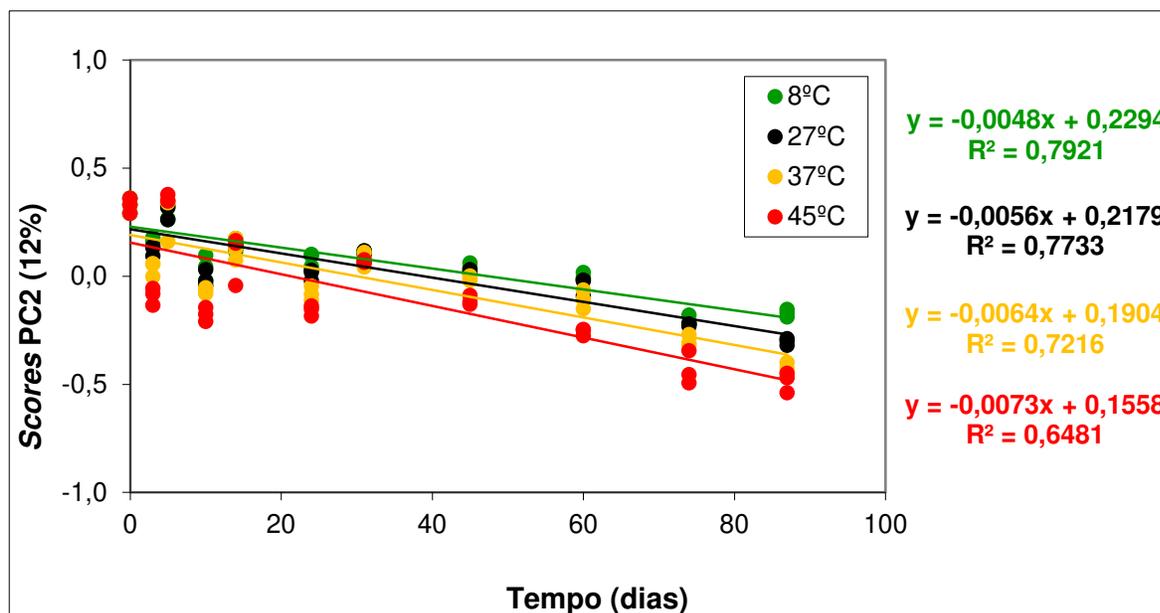


Figura 32. Ajuste dos scores para PC2 (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).

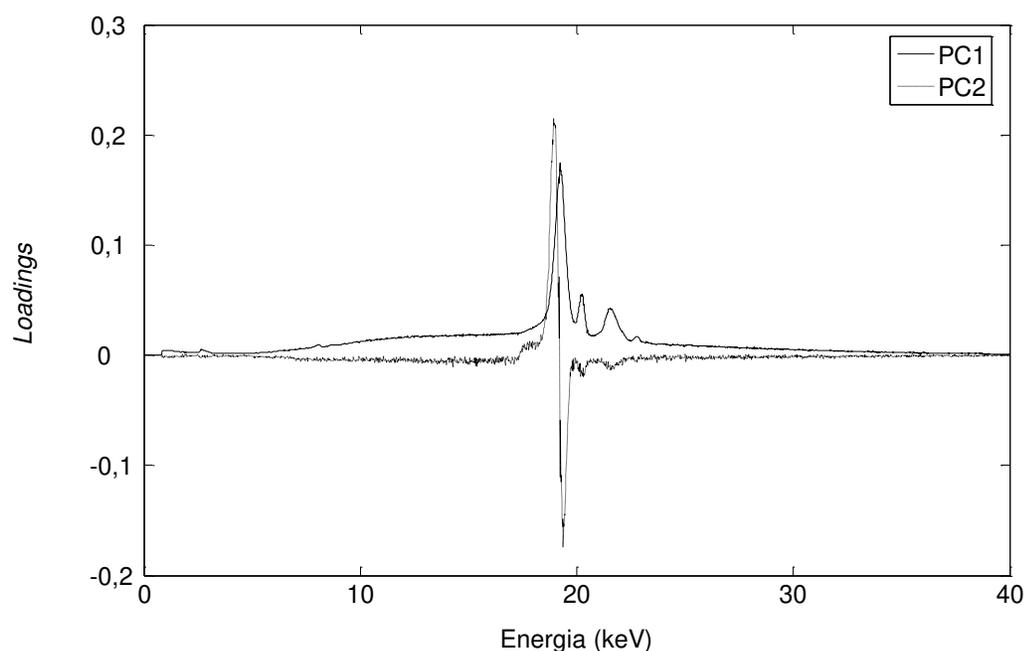


Figura 33. *Loadings* para PC1 e PC2 (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).

Como mencionado no Capítulo I, o método MASLT vem da natureza da PCA (em que as componentes principais são extraídas em ordem decrescente de variância explicada) e, por isso, era esperado que as primeiras PCs trouxessem informações relativas à perda de fragrância, fato não observado nesse caso.

Quando isso é observado, a natureza multivariada do MASLT pode ser usada como uma ferramenta para diagnóstico de possíveis falhas na execução do estudo de validade e os procedimentos de estocagem, amostragem e aquisição dos dados devem ser cuidadosamente revistos. Para os dados obtidos por Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X, a falta de informação relacionada ao tempo na PC1 pode ser explicada pela variação na apresentação das pastilhas (trincas e rachaduras, quebras, etc.) e pelas alterações físicas sofridas pelo produto ao longo do estudo (diminuição do teor de umidade, etc.), fatores que interferem no espalhamento da radiação de raios-X. Analisando o gráfico de

RESULTADOS E DISCUSSÃO

loadings (Figura 33), verifica-se que a PC1 é influenciada pelo espalhamento da fonte de raios-X, que poderia estar relacionado à perda de fragrância, mas que nesse caso pode ter respondido também à toda a variação na apresentação das amostras e nas características físicas do produto. Esse mesmo fenômeno não foi observado para os resultados de HS-SPME-GC-MS porque havia um processo de extração envolvido nesse caso, modificando a amostra.

A análise de *loadings* para PC2 (Figura 33) mostra que ela também foi influenciada pelo espalhamento da fonte de raios-X, mas seus *scores* apresentaram uma relação temporal sequencial, relacionada com a perda de fragrância e com a perda de água. Assim, os dados de PC2 foram ajustados de acordo com a Equação 4 e a Tabela 11 mostra que o melhor ajuste foi obtido com $n = 0$.

O gráfico da Figura 34 mostra a relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura. A energia de ativação envolvida no processo foi calculada a partir da Equação 8 e o valor obtido foi de 9 ± 2 kJ/mol.

Tabela 11. Ajuste dos *scores* para PC2 (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).

Temperatura (°C)	r^2 para $n = 0$	r^2 para $n = 1$	r^2 para $n = 2$
8	0,7921	0,7080	0,0442
27	0,7733	0,3646	0,0125
37	0,7216	0,4192	0,0465
45	0,6481	0,3478	0,0010

Nota: n = ordem de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

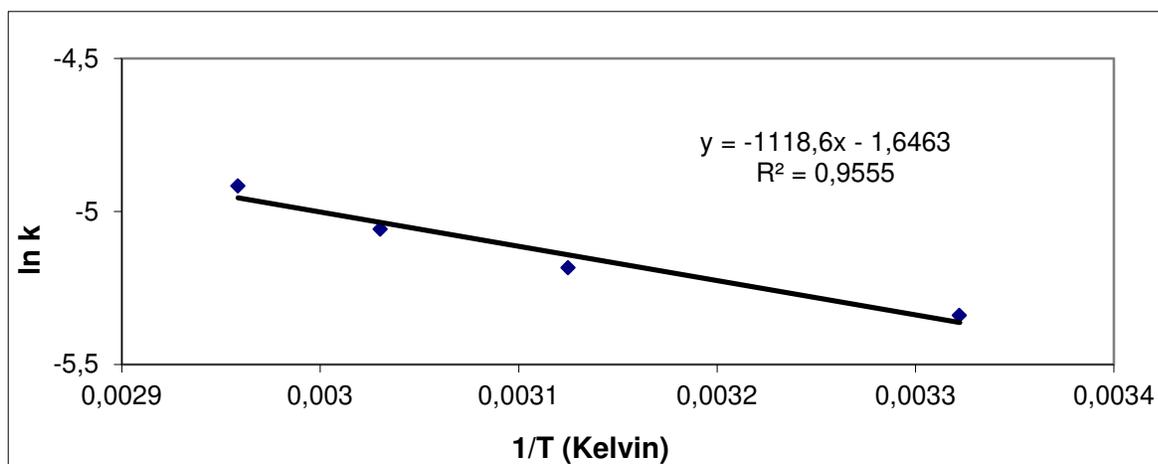


Figura 34. Relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura, através da lei de Arrhenius (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).

Finalmente, os valores calculados de k foram utilizados para calcular o prazo de validade do sabonete em barra a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando os *scores* iniciais, P_0 , e crítico (ponto de corte sensorial), P_t , para as temperaturas de 37 e $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabela 12).

Tabela 12. Cálculo do prazo de validade para $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ usando os dados obtidos a 37 e $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X).

Técnica analítica: Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X				
$T\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$k\text{ (P/dia)}$ $n = 0$	P_t^1	P_0	Prazo de validade a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ – calculado ² (dias)
8	$0,0048 \pm 0,0004$			
27	$0,0056 \pm 0,0005$			
37	$0,0064 \pm 0,0007$	-0,010	0,327	60 ± 6
45	$0,007 \pm 0,001$	0,068	0,327	46 ± 5

Nota: n = ordem de reação.

¹ Os prazos de validade determinados pelo painel sensorial para as temperaturas de 37 e $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram 45 e 31 dias, respectivamente.

² Utilizando a equação $P_t - P_0 = kt$ e os valores de P_t , P_0 e $k_{27\text{ }^{\circ}\text{C}}$ mostrados na Tabela 12.

Observando os dados mostrados na Tabela 12, verifica-se que o prazo de validade calculado para 27 °C foi de 60 ± 6 dias, usando o corte sensorial de 37 °C, ou 46 ± 5 dias, utilizando os dados de 45 °C. Enquanto que o primeiro deles está de acordo com o prazo de validade determinado sensorialmente (59 ± 7 dias), o segundo não concorda com o esperado, apresentando um prazo de validade menor que aquele determinado pelo painel sensorial.

Essa divergência pode ser explicada pela variação do conjunto de dados obtido para as amostras estocadas a 45 °C, observada, inclusive, pelo baixo valor do coeficiente de correlação da curva de regressão linear ajustada para esses dados ($r^2 = 0,6481$), como também pela influência da perda de água, da variação da apresentação das amostras e das alterações físicas do produto nos espectros obtidos por Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X.

IV. 5. ANÁLISE MULTIVARIADA DE PERDA DE FRAGRÂNCIA EM SABONETE EM BARRA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

A terceira técnica analítica investigada para análise de perda de fragrância em sabonete em barra foi a Espectroscopia no Infravermelho Próximo, uma vez que já havia sido utilizada anteriormente para determinação do prazo de validade de bens de consumo e que constitui uma fonte de baixo custo, confiável e rápida para obtenção de informações químicas quantitativas relacionadas ao produto.

A Figura 35 mostra um espectro típico obtido para as amostras de sabonete em barra (estocadas por 3 dias a 27 °C) analisadas por Espectroscopia no Infravermelho Próximo.

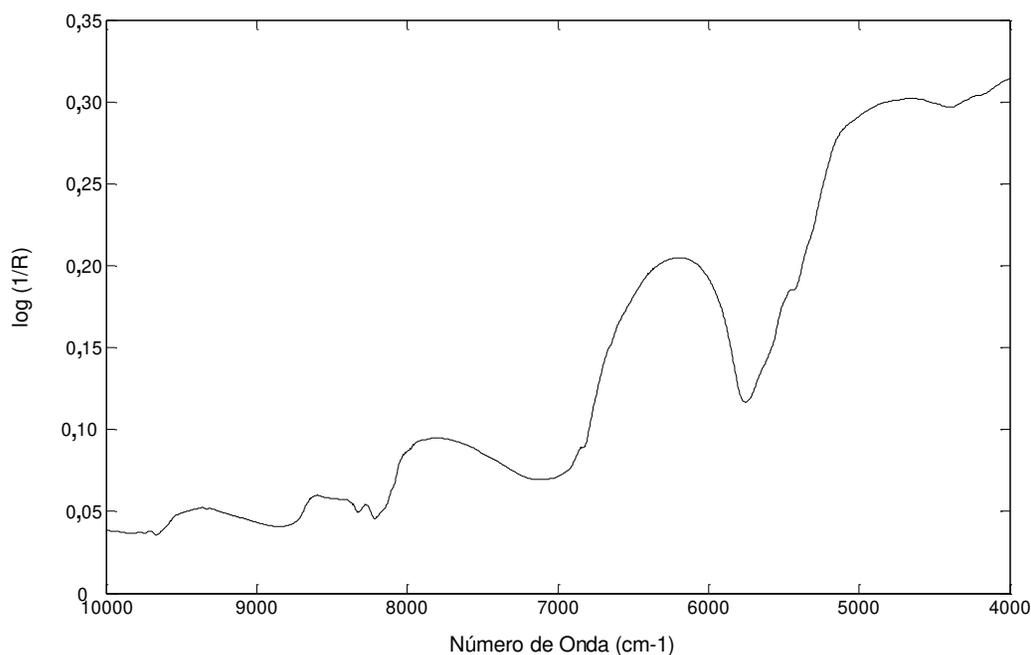


Figura 35. Espectro típico no Infravermelho Próximo obtido para amostra de sabonete em barra.

Após o tratamento de todos os espectros obtidos, a PCA demonstrou que a componente principal 1 explicou 93% da variância, enquanto a 2 explicou outros 5%. Os *scores* para PC1 são apresentados na Figura 36 e apresentam relação temporal sequencial. Apesar dessa técnica também ser bastante sensível a alterações na apresentação da amostra e nas características físicas do produto, barras inteiras de sabonete foram utilizadas para análise, eliminando a variação originada pela apresentação das pastilhas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

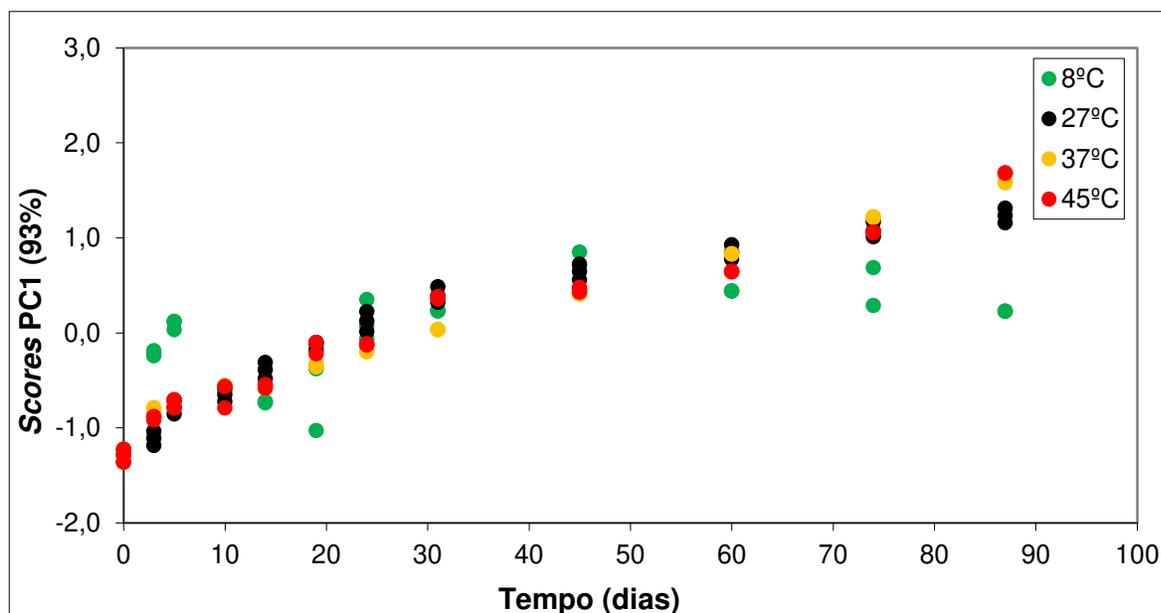


Figura 36. Scores para PC1 (Espectroscopia no Infravermelho Próximo).

Os scores para PC1 foram ajustados pela Equação 4 e, assim como no caso de Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X, o melhor ajuste foi obtido com $n = 0$ (Tabela 13). A relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura (através da lei de Arrhenius) é mostrada na Figura 37 e o valor de energia de ativação calculado foi de 20 ± 6 kJ/mol.

Tabela 13. Ajuste dos scores para PC1 (Espectroscopia no Infravermelho Próximo).

Temperatura (°C)	r^2 para $n = 0$	r^2 para $n = 1$	r^2 para $n = 2$
8	0,4132	0,1628	0,0186
27	0,8973	0,8918	0,0024
37	0,9817	0,8834	0,0174
45	0,9500	0,9339	0,1578

Nota: n = ordem de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

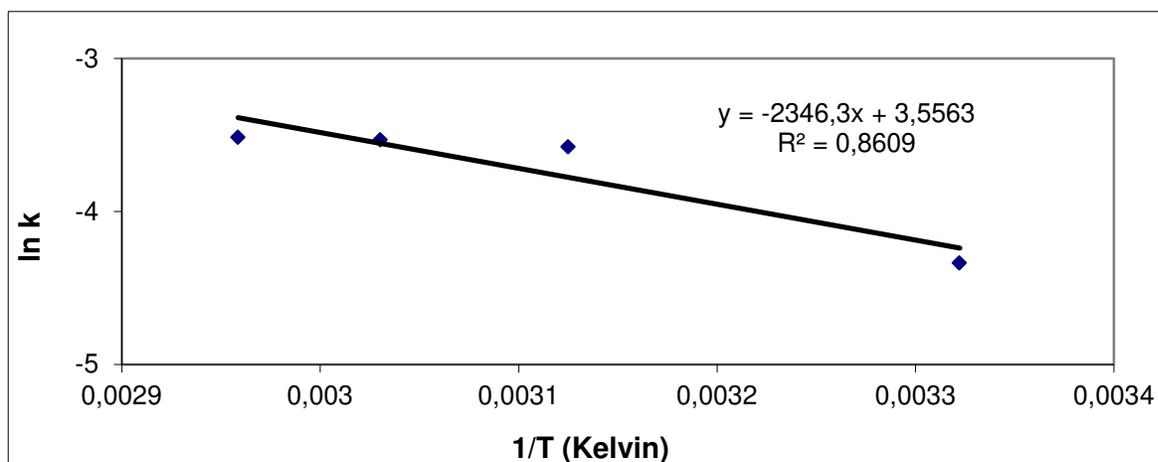


Figura 37. Relação entre $\ln k$ e o inverso da temperatura, através da lei de Arrhenius (Espectroscopia no Infravermelho Próximo).

Após, os valores de k mostrados na Tabela 13 foram utilizados para calcular o prazo de validade do sabonete em barra a 27 °C (Tabela 14).

Tabela 14. Cálculo do prazo de validade para 27 °C usando os dados obtidos a 37 e 45 °C (Espectroscopia no Infravermelho Próximo).

Técnica analítica: Espectroscopia no Infravermelho Próximo				
T (°C)	k (P/dia) n = 0	P_t^1	P_0	Prazo de validade a 27 °C – calculado ² (dias)
8	0,013 ± 0,001			
27	0,028 ± 0,002			
37	0,0298 ± 0,0007	0,439	-1,289	62 ± 8
45	0,029 ± 0,001	0,361	-1,289	59 ± 9

Nota: n = ordem de reação.

¹ Os prazos de validade determinados pelo painel sensorial para as temperaturas de 37 e 45 °C foram 45 e 31 dias, respectivamente.

² Utilizando a equação $P_t - P_0 = kt$ e os valores de P_t , P_0 e $k_{27^\circ\text{C}}$ mostrados na Tabela 14.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos dados mostrados na Tabela 14, verifica-se que o prazo de validade calculado para 27 °C foi de 62 ± 8 dias, usando o corte sensorial de 37 °C, ou 59 ± 9 dias, usando os dados de 45 °C, e ambos estão de acordo com aquele determinado sensorialmente (59 ± 7 dias).

Entretanto, verifica-se que os valores de k calculados para 27, 37 e 45 °C foram muito próximos, mostrando que as diferentes temperaturas não tiveram impacto significativo nos espectros, fenômeno também observado para o caso de Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (Tabela 12). Nos dois casos, as técnicas avaliadas são sensíveis às diversas alterações ocorridas na barra de sabonete em função do tempo durante a estocagem (perda de umidade, perda de fragrância, aumento no índice de refração do material, alterações na microestrutura do produto, etc.), ou seja, há vários fenômenos ocorrendo nas amostras e interferindo nos resultados obtidos, impedindo que esses reflitam somente a perda de fragrância observada. Além disso, uma vez que esses fenômenos podem causar variações positivas ou negativas nos espectros, a soma de todos eles pode gerar um efeito total nulo na variação dos espectros em função do tempo, explicando a aparente falta de sensibilidade dessas duas técnicas para as diferentes temperaturas utilizadas nesse trabalho.

V – CONCLUSÃO

“Não se preocupe em tomar a decisão certa...pois ela não existe.”
(Fernão Capelo Gaivota)

V. 1. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho possibilitaram o desenvolvimento de um método empregando técnicas analíticas instrumentais aliadas a métodos quimiométricos para análise de perda de fragrância em sabonetes em barra, visando acelerar a obtenção dos dados necessários para a determinação do prazo de validade desse tipo de produto.

A técnica de HS-SPME-GC-MS possibilitou que dados originários de instrumentação analítica fossem utilizados diretamente para o estudo das propriedades de interesse e determinação do prazo de validade do produto, permitindo a realização de estudos mais rápidos e robustos, não baseados apenas em respostas subjetivas oriundas de painéis sensoriais. Além disso, a técnica foi eficiente em determinar o prazo de validade do produto (59 ± 5 dias, usando o ponto de corte sensorial de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou 60 ± 5 dias, usando os dados de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$), concordando com o prazo determinado sensorialmente (59 ± 7 dias) e sendo a mais indicada para a aplicação em questão. O uso de temperaturas mais elevadas permitiu que o estudo de prazo de validade acelerado fosse concluído em 45 dias no caso de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 31 dias para a condição de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou seja, metade do tempo necessário para a condição ambiente (59 dias), o que representa uma grande vantagem do método proposto.

A análise univariada dos compostos químicos constituintes da fragrância a partir dos dados de HS-SPME-GC-MS também foi investigada, mas se mostrou inadequada para o propósito em questão. Apesar de grande valia para entendimento da perda de cada um componentes da fragrância, os processos de difusão e volatilização envolvidos apresentaram velocidades bastante distintas e o prazo de validade calculado para o produto a partir da análise univariada variaria de 16 (fenil etanol) a 128 dias (diidromircenol), dependendo do composto avaliado.

CONCLUSÃO

As outras duas técnicas avaliadas, Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X e Espectroscopia no Infravermelho Próximo, se mostraram pouco adequadas ao objetivo proposto, visto que os dados obtidos apresentaram grande interferência de outras variações ocorridas nas amostras (perda de umidade, alterações na apresentação da amostra, mudanças na microestrutura do produto, etc.), não refletindo somente a perda de fragrância. Elas foram capazes de analisar a variação da barra de sabonete como um todo, apresentaram alguma sensibilidade em relação à perda de fragrância, mas trabalhos futuros em técnicas de amostragem devem ser desenvolvidos para utilização dessas técnicas para esse fim.

VI – PERSPECTIVAS

“Nós devemos ser a mudança que queremos ver no mundo.”
(Gandhi)

VI. 1. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuação desse trabalho, algumas possibilidades podem ser destacadas:

- uso da temperatura de 60 °C para análise de perda de fragrância em sabonete em barra utilizando maior frequência de análise. O uso dessa condição permitiria acelerar ainda mais a obtenção dos dados, reduzindo o tempo de estudo para determinação do prazo de validade do produto. Entretanto, como mencionado no Capítulo IV desse trabalho (vide item IV.2.), o ponto de corte pelo painel sensorial ocorre muito rapidamente no caso dessa temperatura, sendo necessário a realização de análises diárias para acompanhamento dos dados;

- estudo de novas formas de preservação para as amostras utilizadas como padrão durante as avaliações sensoriais. Essas amostras devem ser uma representação válida do produto recém produzido durante todo o estudo de prazo de validade e para isso a sua condição de estocagem deve ser capaz de impedir a ocorrência dos fenômenos de perda de fragrância observados;

- desenvolvimento de outras técnicas de amostragem e análise, mais rápidas e de menor custo quando comparadas à HS-SPME-GC-MS. Um exemplo seria o desenvolvimento de um método de amostragem para análise do *headspace* por Espectroscopia no Infravermelho;

- desenvolvimento de novas técnicas de amostragem para o uso de Espectroscopia de Raios-X e Espectroscopia no Infravermelho Próximo na análise de perda de fragrância em sabonetes em barra;

- aplicação do método desenvolvido para análise de aroma em alimentos, empregando cromatografia (líquida ou gasosa) aliada a quimiometria para determinação do prazo de validade do produto em menor tempo.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

“O conflito não é entre o bem e o mal, mas entre o conhecimento e a ignorância.”
(Buda)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. 1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] EUROMONITOR INTERNATIONAL. Disponível em: <http://www.euromonitor.com>. Acesso em 17.11.2013.
- [2] SPITZ, L. *SODEOPEC (Soaps, Detergents, Oleochemicals, and Personal Care Products)*. Champaing: AOCS Press, 2004.
- [3] WEST, T. F.; STRAUZ, H. J.; BARTON, D. H. R. *Synthetic Perfumes*. Londres: Edward Arnold & Co., 1949.
- [4] CALKIN, R. R.; JELLINEK, J. S. *Perfumery. Practice and Principles*. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1994.
- [5] LIEBIG, J.; WOHLER, F. Ueber die bildung des bittermandelöls. *Annalen der Pharmacie*. 22(1): 1-24, 1837.
- [6] SECONDINI, O. *Handbook of Perfumes and Flavours*. Nova Iorque: Chemical Publishing Co., 1990.
- [7] LEFFINGWELL & ASSOCIATES. Disponível em: http://www.leffingwell.com/top_10.htm. Acesso em 17.11.2013.
- [8] AUGUSTO, A.; LEITE E LOPES, A.; ZINI, C. A. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(3): 160-169, 2003.
- [9] UDAKA, T.; TARO, U. *Purification of beta-phenyl ethyl alcohol used as fragrance component, involves supplying to-be-purified beta-phenyl ethyl alcohol to fractionating column, and producing beta-phenyl ethyl alcohol as side-cut fraction*. Patent number WO2008088074-A1. Japão, 2008.
- [10] PARSLOW, L.; WILDE, P. F. *Process for extracting a target compound using HFO1234yf*. Patent number WO2010034112-A1. Canadá, 2010.
- [11] HENNIG, P.; STEINBORN, A.; ENGEWALD, W. Investigation of the composition of *Pinus peuce* needle oil by GC-MS and GC-GC-MS. *Chromatographia*, 38(11-12): 689-693, 1994.
- [12] FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SEVINATE-PINTO, I.; ANTUNES, T.; FOTINHA, S. S.; LOOMAN, A.; SCHEFFER, J. J. C. Composition of the essential oil of *Lavandula pinnata* L. fil. var. *pinnata* grown on madeira. *Flavour and Fragrance Journal*, 10: 93-96, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [13] AMTMANN, A. The chemical relationship between the scent features of goldenrod (*Solidago canadensis* L.) flower and its unifloral honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 122–129, 2010.
- [14] LANÇAS, F. M. Extração com fluido supercrítico: Quo vadis? *Revista Analítica*, 2: 30-36, 2002.
- [15] VARONA, S.; MARTIN, A.; COCERO, M. J.; GAMSE, T. Supercritical carbon dioxide fractionation of *Lavandin* essential oil: experiments and modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, 45: 181-188, 2008.
- [16] ROUT, P. K.; NAIK, S. N.; RAO, Y. R. Subcritical CO₂ extraction of floral fragrance from *Quisqualis indica*. *Journal of Supercritical Fluids*, 45: 200–205, 2008.
- [17] GIRAY, E. S.; KIRICI, S.; KAYA, D. A.; TURK, M.; SONMEZ, O.; INAN, M. Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta*, 74(4): 930-935, 2008.
- [18] FIGOLI, A.; DONATO, L.; CARNEVALE, R.; TUNDIS, R.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F.; DRIOLI, E. Bergamot essential oil extraction by pervaporation, *Desalination*, 193: 160-165, 2006.
- [19] FARAH, A.; FECHTAL, A. A. M.; CHHEN, A.; SATRANI, B.; TALBI, M.; CHAOUCH, A. Fractional distillation effect on the chemical composition of Moroccan myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 351-354, 2006.
- [20] JURGENS, A.; DOTTERL, S.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. Chemical diversity of floral volatiles in Asclepiadoideae-Asclepiadeae (*Apocynaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 842–852, 2006.
- [21] HAEFLIGER, O. P.; JECKELMANN, N.; OUALI, L.; LEON, G. Real-Time monitoring of fragrance release from cotton towels by low thermal mass gas chromatography using a longitudinally modulating cryogenic system for headspace sampling and injection. *Analytical Chemistry*, 82: 729–737, 2010.
- [22] BELARDI, R. E.; PAWLISZYN. The application of chemically modified fused silica fibers in extraction of organics from water matrix samples, and their rapid transfer to capillary column. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 24(1): 179-191, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [23] ZAKARIA, Z.; ZAKARIA, S.; ISHAK, M. A. M. Analysis of major fragrant compounds from *Citrus grandis* flowers extracts. *Sains Malaysiana*, 39(4): 565–569, 2010.
- [24] LAMAS, J. P.; SANCHEZ-PRADO, L.; GARCIA-JARES, C.; LLIMPART, M. Solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry determination of fragrance allergens in baby bathwater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394: 1399–1411, 2009.
- [25] LAMAS, P.; SANCHEZ-PRADO, L.; LORES, M.; GARCIA-JARES, C.; LLIMPART, M. Sorbent trapping solid-phase microextraction of fragrance allergens in indoor air. *Journal of Chromatography A*, 1217: 5307–5316, 2010.
- [26] PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E.; MILLS, G. A. Meeting report: Recent progress in sample extraction. A report on the ExTech 2007 Symposium at Alesund, Norway, 3-6 june 2007. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(9): 843-846, 2007.
- [27] BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; CRAMERS, C. Sorptive sample preparation – a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(1-2): 3-22, 2002.
- [28] ARMENTA, S.; GARRIGUES S.; DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(6): 497-511, 2008.
- [29] FLORIDA CHEMICAL COMPANY, INC. Disponível em: <http://www.floridachemical.com/whatisd-limonene.htm>. Acesso em 17.11.2013.
- [30] ASTEN, A. The importance of GC and GC-MS in perfume analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 21(9-10): 698-708, 2002.
- [31] PIETROGRANDE, M. C.; BASAGLIA, G. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11): 1086-1094, 2007.
- [32] ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; VREULS, R.J.J.; BRINKMAN, U.A.TH. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC) IV. Further applications, conclusions and perspectives. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(8): 821-840, 2006.
- [33] SHELLIE, R. A.; MARRIOTT, P. J.; CHAINTREAU, A. Quantitation of suspected allergens in fragrances (Part I): evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography for quality control. *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 91-98, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [34] WYSZYNSKI, B.; NAKAMOTO, T. Linking biological and artificial olfaction: biomimetic quartz crystal microbalance odor sensors. *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, 4(3): 334-338, 2009.
- [35] PERSAUD, K.; DODD, G. Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature*, 299: 352–355, 1982.
- [36] MARTÍ, M. P.; BOQUÉ, R.; BUSTO, O.; GUASH, J. Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(1): 57-66, 2005.
- [37] PAVÓN, J. L. P.; SANCHEZ, M. N.; PINTO, C. G.; LAESPADA, M. F.; CORDERO, B. M.; PEÑA, A. G. Strategies for qualitative and quantitative analyses with mass spectrometry-based electronic noses. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(3): 257-266, 2006.
- [38] DITTMANN, B.; NITZ, S.; HORNER, G. A new chemical sensor on a mass spectrometry basis. *Advanced Food Science*, 20(3-4): 115-121, 1998.
- [39] ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (RDC 211 de 14/06/2005). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em 24.11.2013.
- [40] PEDRO, A. M. K. P. *Desenvolvimento do método multivariado acelerado para determinação do prazo de validade de produtos unindo quimiometria e cinética química*. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2009.
- [41] HOUSE, J. E. *Principles of Chemical Kinetics*. 2ª edição. Burlington: Academic Press, 2007.
- [42] LAIDLER, K. J. *Chemical Kinetics*. 3ª edição. Nova Iorque: Benjamin Cummings, 1997.
- [43] ATKINS, P.; DE PAULA, J. *Physical Chemistry*. 7ª edição. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company, 2002.
- [44] MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR-MDIC, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL-INMETRO, *Portaria INMETRO N° 126 de 19 de novembro de 1999*.
- [45] PEREIRA, C. S. C. *Estudo de substantividade de uma composição aromática na pele em função do ciclo menstrual*. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

[46] ICS – INTERNATIONAL CHEMOMETRICS SOCIETY. Disponível em: <http://www.namics.nysales.cornell.edu/index.html>. Acesso em 24.11.2013.

[47] LABORATÓRIO DE QUIMIOMETRIA EM QUÍMICA ANALÍTICA. Disponível em: <http://laqqa.igq.unicamp.br/Quimiometria.html>. Acesso em 24.11.2013.

[48] KATEMAN, G.; BUYDENS, L. *Quality Control in Analytical Chemistry – A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications*. Nova Iorque: Wiley-Interscience, 1993.

[49] MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. *Revista Analytica*, 6: 38-50, 2003.

[50] KOWALSKI, B. R. *Chemometrics. Mathematics and Statistics in Chemistry*. Dordrecht: D. Reidel Publishing Company, 1984.

[51] SJÖNSTRÖM, M.; KOWALSKI, B. R. A Comparison of five pattern recognition methods based on the classification results from six real data bases. *Analytica Chimica Acta*, 112: 11-30, 1979.

[52] MALINOWSKI, F.; HOWERY, D. *Factor Analysis in Chemistry*. Nova Iorque: Wiley-Interscience, 1980.

[53] FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, 22: 724-731, 1999.

[54] NIAZI, A.; AZIZI, A. Orthogonal signal correction – Partial least squares method for simultaneous spectrophotometric determination of nickel, cobalt and zinc. *Turkish Journal of Chemistry*, 32: 217-228, 2008.

[55] SOUZA, A. M.; GODOY, L. F.; BREITKREITZ, M. C.; SOUSA, S. A. A.; ROTSCCHILD, L.; POPPI, R. J. *Alinhamento de cromatogramas em CLAE para análise multivariada*. Pôster apresentado na 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

[56] RIBEIRO, J. S.; AUGUSTO, F.; FERREIRA, M. M. C.; SALVA, T. J. G. Uso de perfis cromatográficos de voláteis de cafés arábicas torrados para a diferenciação

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

das amostras segundo o sabor, o aroma e a qualidade global de bebida. *Química Nova*, 33(9): 1897-1904, 2010.

[57] ZHU, M. Rapid study of fragrance loss from commercial soap after use by solid phase microextraction–GC-MS and olfactory evaluation. *Analytical Sciences*, 22: 1249-1251, 2006.

[58] SILVA, G. A. *Utilização de métodos quimiométricos em cromatografia gasosa com microextração em fase sólida*. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2007.

[59] GODINHO, R. B. *Avaliação de fragrância em detergente em pó por cromatografia gasosa e métodos quimiométricos*. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2009.

[60] BEDENDO, A. M. K. P. *Determinação de resíduos de contaminantes orgânicos em matrizes alimentícias e ambientais por microextração em fase líquida suportada por membranas e detecção por LCMS/MS e GC-ECD*. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

[61] ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A*, 902: 167-194, 2000.

[62] Commission on Analytical Nomenclature. *IUPAC Analytical Chemistry Division*, 1974.

[63] SANT'ANNA, B. M. P.; FONTES, S. P.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(5): 984-989, 2007.

[64] JENKINS, R. *X-Ray Fluorescence Spectrometry*. 2ª edição. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1999.

[65] SALVADOR, V. L. R. *Introdução a técnica de Espectrometria de Fluorescência de Raios-X*. Shimadzu, 2000.

[66] BUENO, M. I. M. S.; CASTRO M. T. P. O; SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, E. B. S.; TEIXEIRA, A. P. X-ray scattering processes and chemometrics for differentiating complex samples using conventional EDXRF equipment. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 78(1-2): 96-102; 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [67] ALEXANDRE, T. L. *Espectrometria de raios-X aliada à quimiometria no estudo de vegetais*. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2007.
- [68] ALEXANDRE, T. L.; BUENO, M. I. M. S. Classification of some species, genera and families of plants by X-ray spectrometry. *X-ray Spectrometry*, 35: 257-260, 2006.
- [69] WANG, C.; VICKERS, T. J.; MANN, C. K. Direct assay and shelf-life monitoring of aspirin tablets using Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16: 87-94, 1997.
- [70] BEATTIE, R.J.; BELL, S. J.; FARMER, L. J.; MOSS, B. W.; DESMOND, P. D. Preliminary investigation of the application of Raman spectroscopy to the prediction of the sensory quality of beef silverside. *Meat Science*, 66(4): 903-913, 2004
- [71] COMPTON, D. A. C.; COMPTON, S. V. Examination of packaged consumer-goods by using FT-Raman spectrometry. *Applied Spectroscopy*, 45(10): 1587-1589, 1991.
- [72] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*. Nova Iorque: Thomas Learning, 1998.
- [73] BRAGA, J. W. B. *Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada, aplicada na determinação de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo e médio*. Tese (Mestrado em Química). Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2004.
- [74] PEDRO, A. M. K.; FERREIRA, M. M. C. The use of near-infrared spectroscopy and chemometrics for determining the shelf-life of products. *Applied Spectroscopy*, 63(11): 1308-1314, 2009.
- [75] CHEN Y. R.; HUFFMAN, R. W.; PARK, B. Changes in the visible/near-infrared of chicken carcasses in storage. *Journal of Food Process Engineering*, 19: 121-134, 1996.
- [76] NIELSEN, H., ESAIASSEN, M., HEIA, K., SIGERNES, F. Visible/near-infrared spectroscopy: a new tool for the evaluation of fish freshness? *Journal of Food Science*, 67: 1821-1826, 2002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[77] GIARDINA, C.; CATTANEO, T. M. P.; BARZAGHI, S. Study of modifications in delactosated milk during shelf-life by NIR and FT-IR spectroscopy. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 58: 363-366, 2003.

[78] CATTANEO, T. M. P.; GIARDINA, C.; SINELLI, N.; RIVA, M.; GIANGIACOMO, R. Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to study the shelf-life of crescenza cheese. *International Dairy Journal*, 15: 693-700, 2005.

[79] SINELLI, N.; BARZAGHI, S.; GIARDINA, C.; CATTANEO, T. M. P.; A preliminary study using Fourier transform near infrared spectroscopy to monitor the shelf-life of packed industrial ricotta cheese. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 13: 293-300, 2005.