



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

SORAIA CRISTINA GONZAGA NEVES BRAGA

**DETERMINAÇÃO DE *OFF-FLAVOURS* EM CARNE E
GORDURA SUÍNA POR GC×GC COMBINADA A SPME**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA
NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

ORIENTADOR: PROF. DR. FABIO AUGUSTO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA

POR SORAIA CRISTINA GONZAGA NEVES BRAGA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. FABIO AUGUSTO.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

B73d

Braga, Soraia Cristina Gonzaga Neves (1986-).
Determinação de *off-flavours* em carne e gordura
suína por GCxGC combinada a SPME / Soraia Cristina
Gonzaga Neves Braga. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Fabio Augusto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Androstenona. 2. Escatol. 3. Microextração em
fase sólida. 4. Cromatografia gasosa bidimensional
abrangente. I. Augusto, Fabio. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Off-flavour determination in pork meat and fat by GCxGC combined with SPME

Palavras-chave em inglês:

Androstenone

Skatole

Solid phase micro-extraction

Comprehensive two-dimensional gas chromatography

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Fabio Augusto [Orientador]

Carol Hollingworth Collins

Márcio Pozzobon Pedroso

Data de defesa: 17/07/2012

Programa de pós-graduação: Química

Dedico este trabalho aos meus pais Eva e Isonete, a meu marido Filipe e a meus irmãos Camila e Bruno.

Agradecimentos

- À Deus por me dar força e coragem para seguir em frente,
- Aos meus pais, Eva e Izoneite pelo apoio, pela compreensão e por acreditarem em mim,
- Ao meu marido, Filipe pelo incondicional apoio, pelo amor e por me encorajar nos momentos mais difíceis,
- À minha família, meus irmãos Camila e Bruno e meus tios e minhas avós por todos os gestos e manifestações de apoio e satisfação,
- Aos colegas de laboratório Bruna, Carlos, Gabriela, Gisláine, Helga, Hugo, Karina, Leandro (China), Lucília, Mariana, Mayra, Paulo, Raquel, Sandra, Stanislau e Valeska pelo ótimo ambiente de trabalho e pela paciência,
- Ao professor Fabio Augusto, pela oportunidade no desenvolvimento deste trabalho e pela orientação,
- Aos professores José Alberto Fracassi, Carol Hollingworth Collins e Márcio Pozzobon Pedroso pela participação nas bancas de qualificação e defesa,
- A CAPES pela bolsa concedida.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”
Albert Einstein

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica/Titulação

- 2010-Atual:** Mestrado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Título: Detreminação de *off-flavours* em carne e gordura suína por GC×GC combinada a SPME
Orientador: Fábio Augusto
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2006 - 2010** Graduação em Bacharelado em Química.
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicosa, Brasil
- 2002 - 2003** Ensino Profissional de Nível Técnico.
Técnico em Farmácia- Faculdades Integradas de Caratinga, FIC, Caratinga, Brasil

Atuação profissional

Universidade Federal de Viçosa - UFV

- 2009 - 2010** Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20.
2009 - 2009 Vínculo: Monitor nível I, Carga horária: 12.
2007 - 2008 Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20.
2007 - 2007 Vínculo: Monitor nível 1 , Carga horária: 12.

Artigos completos publicados em periódicos

1. SILVA, M. J., Cardoso, Abiney Lemos, NEVES, S. C. G.
Esterification of Oleic Acid for Biodiesel Production Catalyzed by SnCl₂: A Kinetic Investigation. Sensors (Basel). , v.1, p.79 - 92, 2008.
2. Cardoso, Abiney L., NEVES, S. C. G., da Silva, Marcio J.
Kinetic Study of Alcoholysis of the Fatty Acids Catalyzed by Tin Chloride(II): An Alternative Catalyst for Biodiesel Production. Energy & Fuels. , v.23, p. 1718–1722, 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. SILVA, M. J., Cardoso, Abiney L., NEVES, S. C. G.
Tin(II) chloride dihydrate: An efficient Lewis acid catalyst for biodiesel production from of soybean oil with high tenor of free fatty acids In: XXI Simpósio Iberoamericano, 2008, Málaga. Anais do XXI Simpósio Iberoamericano. , 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Braga, S. C. G. N., Bogus Jr, S., Hantao, L. W., Fidélis, C. H., Augusto, F.
Aspectos experimentais na determinação de androstenona e escatol em toucinho de porco

por HS-SPME-GC-FID In: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

2. Braga, S. C. G. N., Hantao, L. W., Bogus Jr, S., Augusto, F., Desenvolvimento de um método para quantificação de off-flavours em toucinho de porco por HS- SPME-GCxGC-qMS In: 16^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão.

3. NEVES, S. C. G., BRAGA, F. L., SPADA, R. F. K., Estudo de Sistema Aquoso Bifásico tipo Sal-Polímero via termodinâmica estatística In: V EVFITA- Encontro de Verão de Física do ITA, 2010, São José dos Campos-SP.

4. NEVES, S. C. G., Queiroz, J. H, BRITO, L. F., QUEIROZ, M. E. L. R., NEVES, A. A., ALVES, R. D., Otimização e Validação da Técnica de Extração Sólido-Líquido por partição em baixa temperatura para análise de triadimenol e deltametrina para caracterização de resíduos de café In: I Simpósio de Integração Acadêmica, 2010, Viçosa-MG.

5. NEVES, S. C. G., Silva, Marcio J., Cardoso, Abiney L., Esterificação de ácidos graxos para produção de biodiesel catalisada por compostos de estanho In: XVIII Simposio de Iniciação Científica, 2008, Viçosa.

6. SILVA, M. J., NEVES, S. C. G., Esterificação etanólica de ácido oleico catalisada por heteropoliácido da série de kegglin H₃PW₁₂O₄₀ In: 14^o Congresso Brasileiro de Catálise, 2007, Porto de Galinhas.

7. SILVA, M. J., NEVES, S. C. G., Esterificação etanolica de ácido oléico na ausência de solvente catalisada por heteropoliácido H₃PW₁₂O₄₀ In: 30^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

8. NEVES, S. C. G., SILVA, M. J., Etanolise do ácido oleico catalisada por compostos de estanho In: XVII Simpósio de Iniciação Científica, 2007, Viçosa.

Resumo

Determinação de *off-flavours* em carne e gordura suína por GC×GC combinada a SPME

A carne de porco é a proteína mais consumida no mundo. Para ser consumida a carne necessita de um padrão de qualidade e um dos problemas que afeta esta qualidade é o surgimento de odores desagradáveis. Estes odores, conhecidos como *boar taint*, são causados principalmente pela presença de androstenona e escatol em níveis maiores que $1,00 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, em gordura suína. Os métodos existentes para determinação destes compostos são dispendiosos e não geram resultados em tempos satisfatórios para análise de rotina. Neste trabalho foi proposto um novo método para determinação de androstenona e escatol em gordura suína que se baseia na utilização de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC). Para isso foi realizada uma otimização univariada do tipo de fibra e agente saponificante e posteriormente uma otimização multivariada, envolvendo concentração de saponificante, tempo de saponificação, temperatura e tempo de extração. O método otimizado foi validado sob os parâmetros de limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão e exatidão. Para o escatol é possível a quantificação de amostras com quantidades menores que as detectadas sensorialmente ($0,25 \mu\text{g g}^{-1}$), com precisão e exatidão, mas para a androstenona, é possível apenas detectar a presença ou não deste analito. Após todo o desenvolvimento e validação do método, este foi aplicado em sete amostras de toucinho cedidas pelo ITAL.

Abstract

Determination of off-flavours in meat and fat pork by GC×GC combined with SPME

Pork is the most consumed protein in the world. For consumption, the meat needs a quality standard and one of the problems concerning the quality of pork meat are off-flavours. These off-flavours, called boar taint are caused by the presence of two compounds, skatole and androstenone, in levels superior to 1.00 and 0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively in pig fat. In order to determine these flavors it is necessary to know the concentrations of androstenone and skatole in pig fat. There are specific methods to analyse these compounds, but they spend a lot of time and require a great number of clean-up steps process. In this work, a faster and cleaner method was proposed to determine the presence of androstenone and skatole in pig fat, based in the solid phase microextraction (SPME) and comprehensive bidimensional gas chromatography (GC×GC). A univariate optimization considering the kind of fibre coating and hydrolysis agent was performed. Later a multivariate optimization was developed to determine the concentration of hydrolysis agent, time of saponification and temperature and time of extraction. The best conditions found for the method were used for its validation. The quantification and detection limits, linearity, accuracy and precision were determined. For skatole it is possible to quantify samples at smaller quantities than those found sensorially (0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$), with precision and accuracy, but for androstenone the method only detects its presence or absence in the analyte. After all the development and validation of the method, it was implemented with seven samples of pig fat, courtesy of ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Carne suína	7
2.2 <i>Boar taint</i>.....	8
2.3 Castração Física e Imunocastração	10
2.4 Métodos Analíticos Desenvolvidos.....	11
2.4.1 Escatol.....	12
2.4.2 Androstenona	14
2.4.3 Escatol e Androstenona.....	17
2.5 Microextração em Fase sólida	18
2.6 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente	21
2.7 Otimização Multivariada: Planejamento Doehlert	28
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Materiais	33
4.2 Métodos	33
4.2.1 Preparo de amostras	33
4.2.2 Condições cromatográficas	34
4.2.3 Determinação dos índices de retenção da androstenona e do escatol	35
4.2.4 Preparo da amostra para extração	35
4.2.5 Determinação da fibra extratora	36
4.2.6 Planejamento Experimental Doehlert	36
4.2.7 Validação do método	39

4.2.8	Análise de Amostras	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Condições cromatográficas em GC convencional e Índices de retenção	42
5.2	Otimização Univariada	44
5.3	Otimização Multivariada	50
5.4	Condições cromatográficas em GC×GC	57
5.5	Validação do método	59
5.6	Aplicação do Método em amostras	66
6	CONCLUSÕES	69
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

Lista de Abreviaturas

¹D: primeira dimensão

1D-GC: Cromatografia Gasosa Monodimensional/Convencional

¹t_R: tempo de retenção na primeira dimensão

²D: segunda dimensão

²t_R: tempo de retenção na segunda dimensão

AD/DA: conversor analógico-digital/digital-analógico

ANOVA: Análise de Variância

Carbowax: polietilenoglicol

CAR/PDMS: fibra de SPME contendo polidimetilsiloxano e carboxen

C18: octadecil

DAD: Detecção por arranjo de diodos

d.i.: diâmetro interno

DB-Wax: coluna capilar com fase estacionária de polietilenoglicol

DVB/CAR/PDMS: fibra de SPME contendo divinilbenzeno, carboxen e polidimetilsiloxano

ECD: detector por captura de elétrons (*electron capture detector*)

Esteróides C16: grupo de esteróides que contém 16 átomos de carbono

EUA: Estados Unidos da América

Fast GC: Cromatografia Gasosa Rápida (*Fast Gas Chromatography*)

FDA: *U.S. Food and Drugs administration*

FID: detector por ionização em chama (*flame ionization detector*)

FSH: hormônio folículo estimulante (*follicle stimulating hormone*)

GC-MS: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometro de Massas (*Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometer*)

GC: Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

GC-FID: Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama

GC×GC: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (*Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography*)

GC×GC-FID: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente com detecção por

ionização em chama

GC×GC-qMS: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrômetro de Massas com analisador quadrupolar

GC-GC: Cromatografia Gasosa Bidimensional de frações parciais

GnRH: Antagonista do hormônio liberador de gonadotrofina

HP-5: coluna capilar com fase estacionária de composição 5% fenil-95% dimetilsiloxano

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

HS-SPME: Microextração em Fase Sólida através da extração do *headspace*

HT-8: carborano

ITAL: Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas-SP)

LD: Limite de detecção

LH: hormônio luteinizante

LQ: Limite de quantificação

m/z: razão massa / carga

MS: Espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

MS/MS: Espectrometria de massas tandem

n_1 : capacidade de picos da primeira dimensão

n_2 : capacidade de picos da segunda dimensão

NIST: National Institute of Standards and Technology

PA: poli(acrilato)

PDMS: poli(dimetilsiloxano)

PDMS/DVB: poli(dimetilsiloxano)/divinilbenzeno

qMS: Espectrômetro de Massas com analisador quadrupolar (*mass spectrometer with quadrupolar analyzer*)

SBSE: extração sortiva por barra de agitação (*Stir-bar sorptive extraction*)

SCAN: modo de varredura

SIM: monitoramento de íons selecionados (*selected ion monitoring*)

SPME: Microextração em Fase Sólida (*solid phase microextraction*)

TFQM: *Total Food Quality Model*

TOFMS: Espectrômetro de Massas com analisador por tempo de voo (*mass spectrometer with time of flight analyzer*)

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

UE: União Européia

UV: Detector por radiação ultravioleta

UV-Vis: Detector por radiação ultravioleta-visível

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores codificados e experimentais (entre parênteses) para o planejamento Doehlert com quatro variáveis para a fibra PDMS/DVB.....	38
Tabela 2: Valores codificados e experimentais(entre parênteses) para o planejamento Doehlert com duas variáveis para a fibra DVB/CAR/PDMS.	39
Tabela 3: Índices de retenção para androstenona e escatol nos equipamentos com detecção por FID e por espectrometria de massas.....	43
Tabela 4: Áreas medidas para escatol e androstenona nas mesmas condições de extração e fibra DVB/CAR/PDMS e mesmas concentrações em toucinho puro.	44
Tabela 5: Média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos durante a avaliação da repetitividade.	64
Tabela 6: Média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos durante a avaliação da precisão intermediária.....	64
Tabela 7: Concentração real (fortificada), estimativa da concentração pela curva de calibração, erro relativo e coeficiente de variação obtidos durante a avaliação da exatidão. .	65
Tabela 8: Amostras obtidas do ITAL que foram analisadas pelo método proposto.	67

Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas dos principais compostos responsáveis pelo <i>boar taint</i> : A - androstenona e B - escatol.....	3
Figura 2:Esquema de um sistema de GCxGC.....	22
Figura 3: A-Ilustração do processo de modulação básico para um modulador de 4 jatos.....	24
Figura 4: Uso da programação de temperatura para gerar um cromatograma ortogonal em cromatografia gasosa bidimensional.....	26
Figura 5: Comparação da capacidade de picos para 1D-GC, GC-GC para a transferência de uma fração e para GCxGC.....	27
Figura 6: Cromatograma mostrando a estruturação cromatográfica de uma amostra de fração de petróleo.....	28
Figura 7: Diferença visual entre amostra de toucinho saponificada sem neutralização (esquerda) e amostra saponificada e neutralizada (direita).	46
Figura 8: Área de pico obtida em função do tipo de preparo de amostra para os dois analitos, utilizando a fibra DVB /CAR/PDMS.	47
Figura 9: Área de pico obtida versus recobrimento de fibra para os dois analitos de interesse.	48
Figura 10: Diagrama de contorno e gráfico de Pareto para a fibra PDMS/DVB para o escatol	51
Figura 11: Diagrama de contorno e gráfico de Pareto para a fibra PDMS/DVB para androstenona.....	52
Figura 12: Diagrama de contorno e gráfico de Pareto para a fibra DVB/CAR/PDMS para o escatol.	54
Figura 13: Diagrama de contorno e gráfico de Pareto para a fibra DVB/CAR/PDMS para androstenona.....	55
Figura 14: Cromatograma típico obtido durante o procedimento de extração com a fibra DVB/CAR/PDMS	56
Figura 15: Cromatograma de GCxGC-FID de uma amostra de toucinho dopada e extraída pelo método otimizado com a fibra PDMS/DVB.	58
Figura 16: Concentração de escatol (A) e androstenona (B) versus área dos picos obtidas para a fibra PDMS/DVB.	60
Figura 17: Curva Analítica para o escatol.	62
Figura 18: Curva Analítica para androstenona.	63
Figura 19: Cromatograma típico (GCxGC-qMS) de amostra com 0,250 $\mu\text{g g}^{-1}$ escatol e 7,70 $\mu\text{g g}^{-1}$ androstenona.....	66

Capítulo 1:

Introdução

1 Introdução

A carne suína é a proteína animal mais consumida no mundo e anualmente são produzidas 115 milhões de toneladas. Aproximadamente 50% provém da China e outros 33% da União Européia (UE) e dos Estados Unidos (EUA) [1]. O Brasil é o quarto maior produtor e quarto maior exportador, com 3% da produção mundial e 11% das exportações no mercado internacional [1].

A qualidade da carne suína é de extrema importância para seu consumo e aceitabilidade dos consumidores e a forma com que estes avaliam a carne depende de vários fatores como a sua cor, textura e *flavour* [2]. Em 1996 Grunert *et al.* [3] desenvolveram um método para análise da qualidade de produtos alimentícios, denominado TFQM , do inglês *Total Food Quality Model*, que é um modelo baseado no número de características percebidas, como características físicas ou outras como preço, marca, etc [2]. Há influência de vários fatores na qualidade da carne, desde fatores genéticos até estresse dos animais no pré-abate [4].

A utilização de porcos machos inteiros (não castrados) na produção de carne suína é vantajosa devido a obtenção de carcaças magras, baixos custos de produção e bem estar do animal [5], entretanto, a grande desvantagem deste tipo de produção é a obtenção de carnes com odores desagradáveis conhecidos como *boar taint*. Este *boar taint*, conhecido também como “odor sexual” ou “odor na carcaça”, tem sido estudado há um longo tempo e é caracterizado por um forte odor de urina e fezes durante o cozimento da carne. Em 1968, Patterson [6] constatou que a androstenona era um dos responsáveis por esse odor e em 1970, Vold [7] isolou o escatol e constatou sua importância no desenvolvimento deste odor. A androstenona é um hormônio esteróide produzido nos testículos de animais sexualmente maduros, que circula na corrente sanguínea e se acumula nas glândulas salivares e tecido adiposo [8] devido à sua alta lipoficidade. Já o escatol é um derivado do triptofano: produzido no intestino, é absorvido pela corrente sanguínea sendo uma parte eliminada na urina e outra acumulada no tecido adiposo, também devido à alta lipoficidade [8]. As estruturas dos dois compostos são mostrados na Figura 1. Vários estudos têm mostrado a relação entre as concentrações destes compostos em gordura e em 1993, Squires [9] propôs que estes dois

compostos são transportados na corrente sanguínea pelo mesmo carregador. Estudos sensoriais mostram a evidência na sinergia desses compostos para o desenvolvimento do odor sexual [10][11].

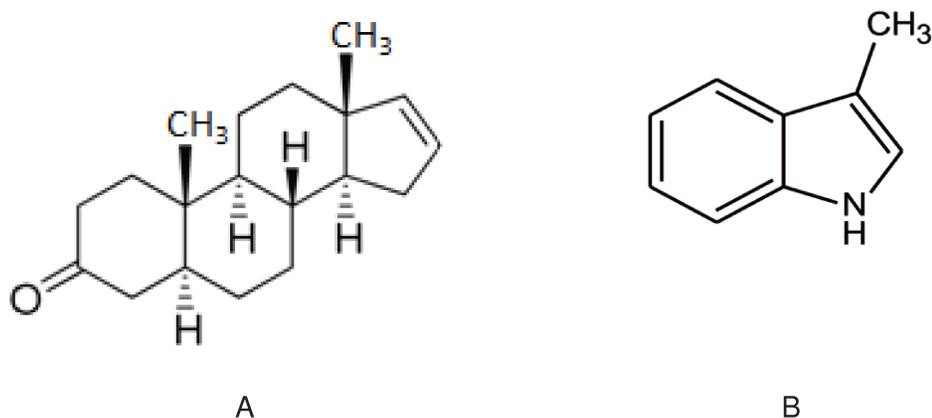


Figura 1: Estruturas dos principais compostos responsáveis pelo *boar taint*: A - androstenona e B - escatol.

Fonte: NIST(National Institute of Standarts and Technology)

Para reduzir este problema é realizada a castração física dos animais machos. Neste tipo de castração, há a retirada dos testículos do porco e isto resulta numa menor razão entre carne magra e gordura, além de causar estresse no porco. Este fato fez com que a Noruega, em 2009, proibisse a produção de carne de porco por este método [12]. Outras formas de castração têm sido desenvolvidas como injeções intratesticulares de ácido lático, interrupção da glândula pituitária hipotálica por administração crônica do antagonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) ou ainda imunização ativa de esteróides sexuais [13]. A imunização por GnRH tem sido estudada mas, devido ao seu alto custo, ainda não é muito utilizada [13].

Devido a importância do escatol e da androstenona, vários métodos analíticos para determinação destes em toucinho de porco tem sido desenvolvidos. O primeiro deles, desenvolvido para quantificar androstenona, utilizou cromatografia gasosa (GC) e foi feito por Claus em 1970 [14]. A partir daí vários métodos foram desenvolvidos para androstenona utilizando extração por cromatografia em camada delgada [15], extração líquido-líquido [16][17][18], extração por fluido supercrítico [4], todos sendo analisados por cromatografia

líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa, além de métodos espectrométricos [19] e métodos imunológicos [20][21][22][23].

Vold, em 1970 [7], também desenvolveu o primeiro método para quantificar escatol em toucinho por GC. Depois, foram desenvolvidos métodos cromatográficos utilizando como preparo de amostra sucessivas etapas de extração líquido-líquido e centrifugação [24], extração líquido-líquido e centrifugação em uma etapa [25], extração líquido-líquido e filtração [26] e extração em fase sólida em cartuchos com fase C18 [27] com posterior quantificação por GC ou HPLC. Métodos espectrométricos também foram desenvolvidos para quantificação de escatol (Mortensen 1983 e Mortensen e Sorensen, 1984, apud [14]), mas estes apresentam a desvantagem de não serem específicos para o escatol, quantificando todos os compostos indólicos presentes na gordura. Métodos para quantificação dos dois analitos simultaneamente foram desenvolvidos por Hansen-Møller em 1994 [28] e por Verheyden *et al.* em 2007 [18]. Estes métodos são dispendiosos e necessitam de várias etapas para se conseguir analisar androstenona e escatol. A microextração em fase sólida (SPME) vem com uma alternativa que pode ser usada, onde em uma única etapa é feita a extração e a purificação das amostras [29].

A SPME foi originalmente desenvolvida por Arthur e Pawliszyn em 1991 [30] e consiste num dispositivo com bastão de fibra ótica de sílica fundida, recoberto com um filme fino de um polímero, que tem espessura variando entre 7 e 100 μm . A extração ocorre quando a fibra é mergulhada na amostra ou no *headspace* da mesma por um certo tempo e, então, é retirada do frasco e exposta no injetor do cromatógrafo. É chamada de extração direta, quando a fibra é colocada em contato íntimo com a amostra, ou de extração através do *headspace*, quando a fibra é exposta no vapor em equilíbrio com a amostra [29]. A SPME tem como vantagem a grande concentração de analitos devido ao seu pequeno volume [29]. A SPME não é uma técnica seletiva para os analitos desejados e então é necessário mais uma forma de separação desses analitos. A cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC \times GC) é a proposta deste trabalho para uma posterior separação dos analitos.

A GC \times GC, inicialmente desenvolvida por Liu e Phillips em 1991 [31], consistia em duas colunas, sendo a primeira dimensão uma coluna de polietilenoglicol (21 m, 0,24 mm d.i.) e a segunda dimensão uma coluna de metilsilicone (1 m \times 0,1 mm d.i.) sendo todo o eluato da primeira coluna injetado na segunda, por um sistema denominado modulador. Esta

técnica tem grande capacidade de pico, sendo este teoricamente igual ao produto da capacidade de picos na primeira dimensão pela capacidade de picos na segunda dimensão ($n_1 \times n_2$) [32]. É interessante que os mecanismos de separação na primeira e segunda dimensão sejam diferentes, pois assim é possível se obter uma melhor separação e cromatogramas estruturados [33]. A GC×GC vem sendo usada em análises de alimentos, desde óleos essenciais, até a análise de frutas, bebidas, produtos lácteos e de origem animal [34].

Aliando SPME com sua capacidade de pré-concentração e isolamento com a grande capacidade de separação dos analitos da GC×GC, pretende-se utilizar as duas técnicas para quantificar analitos, como o escatol e a androstenona, em uma matriz complexa como o toucinho de porco, como uma nova alternativa aos demais métodos.

Capítulo 2:

Revisão Bibliográfica

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Carne suína

A carne suína é a proteína mais consumida no mundo sendo o Brasil atualmente o quarto maior produtor e exportador, onde os cinco maiores importadores de carne suína brasileira são Rússia, Hong Kong, Ucrânia, Argentina e Angola [35] A produção de carne suína no país passou de 3,19 milhões de toneladas para 3,24 milhões de toneladas, sendo este sustentado pelo aumento no peso do abate. Como fundamentos deste crescimento, sobressaem-se o crescimento da produção, a expansão da demanda interna, a valorização da moeda nacional, a elevação dos preços nos mercados interno e externo, o aumento da concorrência internacional e menor oferta de carne bovina no mercado doméstico [1].

A disponibilidade interna de carne suína cresceu 4,1% em 2010, permanecendo abaixo do potencial de consumo, estimado em 15 kg por habitante/ano, sendo que 2010 caracterizou-se por baixos estoques, forte procura pelo produto e preços em alta, os quais sofreram influências de uma oferta insatisfatória de carne bovina [1]. Ao contrário do perfil mundial, o consumo de carne suína no Brasil é inferior ao das carnes de frango e bovina, sendo o consumo preferencialmente através de produtos processados em detrimento da carne suína *in natura* [36].

Os animais preferidos para a produção de carne suína são os machos, devido a um menor percentual de gordura na carne em relação as fêmeas. A utilização de porcos machos não castrados na produção de carne suína é vantajosa devido a obtenção de carcaças magras, baixos custos de produção, melhor conversão de alimento em carne e bem estar do animal [5][13], além de reduzir a quantidade de poluentes excretada pelos animais no ambiente [13]. Mas quando são utilizados os porcos machos sem castração, pode ocorrer um problema que afeta a qualidade da carne, um odor conhecido como *boar taint*, caracterizado por um forte odor de urina e fezes durante o preparo (aquecimento) da carne, que acarreta prejuízo aos produtores.

2.2 *Boar taint*

Como já foi dito, o *boar taint* é um *off-flavor* caracterizado por cheiro de fezes e urina, e se sobressai com qualquer tipo de aquecimento da carne. Vários estudos foram realizados para se determinar quais compostos são responsáveis pelo aparecimento deste odor e o primeiro a isolar um dos compostos responsáveis foi Patterson em 1968 [6]. Ele mostrou que a 5 α -androst-16-en-3-ona, ou androstenona, é um dos principais compostos causadores deste odor e, em 1970, Vold [7] isolou o escatol (3-metil-indol) que juntamente com a androstenona, causam a maior parte deste odor. Cerca de 5 a 10 % dos animais não castrados desenvolvem o *boar taint* [37][38]. Esse odor também é influenciado por fatores genéticos e um dos genes responsáveis por isso é o gene Halotano, revisado por Robic *et al.* em 2008 [38][39].

A androstenona é um hormônio esteróide sintetizado nas células de Leydig, presente nos testículos [40]. É um composto altamente lipofílico e após sua síntese, chega à corrente sanguínea e se acumula principalmente no tecido adiposo e nas glândulas salivares, onde atua como ferormônio [41]. Este composto gera um odor parecido com odor de urina durante o cozimento da carne e, em muitos trabalhos, a quantidade mínima de androstenona detectada pelos consumidores é dita como sendo 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ [42]. Entretanto, no trabalho de Lunde *et al.* em 2010 [11], o limite mínimo encontrado foi de 3,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ para consumidores noruegueses sensíveis a androstenona.

O escatol é um derivado do aminoácido triptofano e é produzido no intestino. Por isso a alimentação que é dada aos animais pode influenciar na quantidade de escatol produzida e acumulada no tecido adiposo, o principal destino deste composto após cair na corrente sanguínea. Ele confere à carne um odor parecido com odor de fezes, gerado durante o aquecimento da mesma. Em alguns trabalhos o *boar taint*, determinado por testes sensoriais, foi mais correlacionado à concentração de escatol na gordura de porco do que à concentração de androstenona [43][44], sendo que o escatol domina a percepção do *boar taint* [43], mas que um odor cerca de três vezes maior está relacionado com o aumento na concentração de androstenona [44]. Outros autores já encontraram que o *boar taint* não depende apenas das concentrações de androstenona e escatol, mas também dos

avaliadores (em análise sensorial) [44][45]. Como é produzido no intestino, o escatol aparece também nas fezes, mas a concentração deste em fezes tem baixa correlação com a concentração em gordura [46]. Kock *et al.*, em 2000, concluíram que o efeito da androstenona no *boar taint* é de fixar o odor do escatol [47], além de concluírem que a temperatura em que é realizado o teste sensorial é muito importante [47].

Alguns estudos mostram a sinergia destes dois compostos no aparecimento do *boar taint*, sendo investigado principalmente em testes sensoriais. Cerca de 70% destes efeitos podem ser explicados pelos níveis de androstenona e escatol, e 58% é explicado pela concentração de escatol e apenas 24% é explicado pela concentração de androstenona[48]. Babol *et al.*, em 2010, relatam que o metabolismo do escatol no fígado pelo citocromo P450IIIE1 está relacionado com síntese testicular da androstenona e por isso a relação entre os níveis de escatol e androstenona no toucinho devem existir. Já outros autores relatam que há formação de um aduto entre estes dois compostos na corrente sanguínea e por isso a concentração destes compostos é correlacionada [49]. Outros autores ainda relatam que na puberdade, devido a ação dos hormônios, as dobras do intestino absorvem mais, promovendo maior produção e absorção de escatol [50]. Babol *et al.* [41], propuseram que a relação entre estes dois compostos é devido síntese de androstenona e o metabolismo hepático do escatol[41]. Neste contexto, ainda não se sabe ao certo qual ou quais motivos são responsáveis pela relação entre as concentrações de escatol e androstenona em toucinho de porco.

Para investigar o *boar taint*, a matriz mais utilizada é o toucinho de porco (gordura costo-lombar), mas em vários trabalhos foram estudada diferentes matrizes, onde tentou-se correlacionar a concentração destes analitos com o teor de escatol e androstenona em toucinho. Alguns trabalhos mostraram a relação entre concentrações de escatol e androstenona em gordura e plasma sanguíneo e os coeficientes de correlação obtidos para o escatol nas duas matrizes foi alto (0,80) e que, para a androstenona, este valor foi menor (0,69) [51] o que difere de outros trabalhos, onde os coeficientes de correlação foram bem menores [41][52]. Também foi estudada a correlação entre amostras de gordura e de soro de porcos, que foram obtidos durante o abate e, com métodos imunológicos, verificou-se a relação entre os níveis de androstenona nestas duas matrizes [53].

Outros compostos também vem sendo apontados como contribuintes para *boar taint*. Vários estudos tem sido feitos, mostrando a contribuição de outros compostos indólicos, como o indol [54], e outros esteróides C16, além de aldeídos e da 4-fenil-3-buten-2-ona, que é apontada por aumentar a detecção de androstenona quando a concentração desta é menor que $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$ [55]. Neste trabalho o foco foi apenas a determinação de androstenona e escatol, pois estes explicam por si cerca de 70% do *boar taint* e são os compostos mais estudados na literatura.

2.3 Castração Física e Imunocastração

Os porcos machos são os principais utilizados na produção de carne e para evitar que o produto com odor desagradável chegue aos consumidores, é realizada a castração destes animais. A forma mais comum de castração é a castração física, onde há a retirada dos testículos do animal antes da puberdade. Esse tipo de castração é laboriosa e pode causar morbidade e mortalidade [13]. Os porcos castrados produzem carnes com menor proporção carne/ gordura, além da conversão de alimento em peso ser menor que em animais inteiros e gerar um maior estresse nos animais. Nos últimos anos vem sendo discutido o bem estar dos animais, e vários estudos mostram o estresse de animais castrados fisicamente em comparação com os não castrados, além de comportamentos distintos, desde uma maior agressividade até uma apatia [13]. Uma alternativa que vem sendo utilizada em vários países, inclusive o Brasil, é a utilização da imunocastração. Bonneau e Enright, em 1995 [13], revisaram diferentes modos de imunocastração sendo estes: injeções intratesticulares de ácido láctico, que resulta na atrofia e esclerose dos testículos, interrupção da glândula pituitária hipotálica por administração crônica de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) ou progesterona sintética usada para prevenir o cio em fêmeas, ou ainda, imunização ativa por esteróides sexuais ou esteróides contrários ao *boar taint* em porcos machos [13]. A forma de imunocastração mais estudada e utilizada é a imunocastração ativa por GnRH. A hormônio gonadotrofina é um neuropeptídeo que é liberado em pulsos através do hipotálamo para estimular a secreção pituitária do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) e o GnRH bloqueia o sinal para produção de LH, FSH e conseqüentemente dos esteróides produzidos nos testículos [40]. Além de reduzir a

concentração dos esteróides testiculares, reduz o tamanho dos testículos, número de espermatozoides e o comportamento agressivo [56][57]. A imunização ativa por GnRH consiste em injeções aplicadas em duas doses, sendo uma geralmente duas semanas após o nascimento e a outra dose quatro semanas antes do abate [58], para que os níveis dos principais compostos responsáveis pelo *boar taint* possam ser eliminados do organismo animal.

Vários estudos têm sido conduzidos comparando porcos castrados fisicamente e imunocastrados. Gispert. *et al.* [58] estudaram a influência da imunocastração em vários parâmetros de qualidade da carne e concluíram que não há diferenças na qualidade da carne devido a imunocastração ou castração física [58]. Zeng *et al.* [59], estudaram a influência da dieta na conversão de alimento em carne e verificaram que os diferentes tipos de dieta não influenciam significativamente o ganho de peso, mas que em porcos imunocastrados, a conversão é melhor que em porcos castrados fisicamente. Baumgartner *et al.* [60], investigaram o comportamento de porcos não castrados, castrados fisicamente e imunocastrados e verificaram que não há diferença no comportamento de porcos imunocastrados e castrados após a segunda dose da vacina, mas antes os porcos imunocastrados são mais ativos[60]. Assim pode ser observado que a imunocastração se apresenta vantajosa em relação a castração física, pois não modifica a qualidade da carne, a conversão de alimento é mais efetiva, e preserva ainda o bem estar dos animais.

2.4 Métodos Analíticos Desenvolvidos

Vários estudos tem sido realizados e diversos métodos analíticos tem sido desenvolvidos para determinar androstenona e escatol em toucinho de porco. Os métodos já desenvolvidos se baseiam em métodos espectrofotométricos, tanto para escatol quanto para androstenona, em reações específicas através de ensaios imunológicos, para a androstenona e também diversos métodos cromatográficos, utilizando tanto GC quanto HPLC, para os dois analitos. Nos métodos cromatográficos, diversos tipos de detectores tem sido utilizados, como FID (detector por ionização em chama), ECD (detector por captura de elétrons) e MS (detector por espectrometria de massas) em GC e UV-VIS (detector UV-Vis) , DAD (detector por arranjo de diiodo), fluorescência e MS em HPLC. Grande parte dos

trabalhos em GC utiliza o detector espectrométrico de massas, principalmente no modo de íons seletivos ou MS/MS (espectrometria de massas tandem) e para HPLC utiliza-se principalmente detecção por espectrometria de massas no modo MS/MS.

Na maior parte dos métodos desenvolvidos a detreminação é feita somente para um dos analitos e existem poucos trabalhos onde os dois compostos são analisados simultaneamente. Há também alguns métodos onde se determina simultaneamente escatol e indol [24][25][26][61] e outros onde se analisam escatol, indol e androstenona[18][28][62].

Uma etapa crítica dos métodos desenvolvidos é o preparo de amostra, que é a etapa mais dispendiosa do método. Várias e diferentes formas de preparo de amostra já foram estudadas. Em diversos trabalhos é utilizada a extração sólido-líquido e em outros trabalhos, a gordura é primeiramente saponificada ou transesterificada, para ser extraída posteriormente. Alguns dos métodos espectrométricos, imunológicos e cromatográficos mais relevantes serão descritos a seguir para exemplificar o trabalho para determinação desses analitos.

2.4.1 Escatol

Em 1984 foi desenvolvido por Mortensen *et al.* (apud [26]) o primeiro método espectrofotométrico para análise de escatol em toucinho de porco que poderia ser utilizado no próprios abatedouros. Para se analisar os compostos indólicos por este método, era necessário que se extraísse o escatol da gordura com Tris-acetona, derivatização com 4-dimetilamino benzaldeído e medida da absorbância em 580 nm. Este método não é específico para o escatol, quantificando todos os compostos indólicos na amostra de gordura [26]. Embora não seletivo, há uma grande correlação ($R=0,973$) entre os resultados deste método e os resultados encontrados em HPLC [28].

Também foram desenvolvidos diversos métodos cromatográficos, sendo que a maior parte deles foi desenvolvida em HPLC. Peleran e Bories em 1985 [24] desenvolveram um método em GC e para isso, utilizaram uma coluna recheada e detecção por MS [24]. Para proceder a análise por GC, era adicionado carbonato de propileno à amostra e o frasco era agitado a 75° C por 15 minutos, sendo centrifugado posteriormente. Uma parte do sobrenadante era transferida para outro frasco onde era adicionado isooctano e novamente o

frasco passava por agitação e centrifugação. A nova fase superior era transferida para outro frasco contendo solução salina, n-pentano e n-tridecilociclohexano. Após agitação, a mistura era transferida para um funil de separação, e a fase aquosa era descartada. O extrato era evaporado, ressuscitado em n-tridecilociclohexano e mantido a 4°C por uma semana para poder ser injetado. Como pode-se observar, o tratamento da amostra era extenso.

Em 1988 Porter *et al.* [63] desenvolveram um método para determinação de escatol e indol em gordura de porco por GC e detecção por FID. As amostras eram homogeneizadas em metanol por 3 vezes, os extratos eram combinados e resfriados a -40°C para precipitação da gordura. O solvente era filtrado, evaporado e o resíduo era diluído em n-heptano e esse extrato passava pelo processo de extração em fase sólida de sílica. Os analitos eram eluídos da coluna e o eluato evaporado a temperatura ambiente. O resíduo, após ser ressuscitado em metanol, era injetado no cromatógrafo. Este método tinha maior aplicabilidade para amostras de rotina, pois permitia a análise de 20 amostras por dia [63].

São vários os métodos desenvolvidos para o escatol utilizando HPLC sendo que em 1986 Garcia-Reguerio *et al.* [61], desenvolveram um método rápido para análise de escatol e indol por HPLC de fase reversa. À amostra de toucinho era adicionado metanol e a mistura era homogeneizada por 1 minuto. Esta mistura passava por um aquecimento à 50 °C por 5 minutos, e o metanol era decantado, sendo este procedimento repetido mais duas vezes. Os extratos metanólicos obtidos eram resfriados a -20 °C por 10 minutos, para precipitação da gordura, a mistura era filtrada, o metanol era evaporado e o extrato seco foi redissolvido em uma mistura de hexano-dietiléter. A limpeza das amostras era realizado com colunas de florisil, contendo sulfato de sódio anidro. Após a eluição da segunda fração da coluna, que continha os analitos, esta fração do eluato era filtrado e injetado no HPLC. O intervalo de concentrações em que o método é linear compreende os valores geralmente encontrados para amostras.

Hansen-Moller em 1992 [27] determinou 13 compostos indólicos, inclusive escatol e indol, em gordura avaliando a detecção por UV e fluorescência. Eram adicionados à amostra uma solução de acetona-tris e solução de padrão interno, após homogeneização, as amostras eram sonicadas por 5 minutos e resfriadas em banho de gelo. A solução passava pelo processo de extração em fase sólida e o eluato era diluído em água e analisado por HPLC fase reversa com detecção por fluorescência, que se mostrou mais sensível que o

detector UV. O limite de quantificação obtido ($15 \mu\text{g g}^{-1}$) para o escatol foi bem menor que a quantidade mínima detectada sensorialmente.

Dehnhard *et al.*, em 1993 [25], utilizaram HPLC em fase reversa para determinar escatol e indol em gordura de porco. Após o aquecimento das amostras em microondas, a gordura líquida era transferida para um tubo contendo n-hexano, onde era adicionado padrão interno e era agitado no vórtex. Adicionava-se uma mistura de acetonitrila e água e agitava-se novamente, sendo a fase superior retirada, usando uma bomba de vácuo, e a fase inferior era injetada no HPLC. Os limites de detecção foram iguais a 4 ng g^{-1} , calculados pela razão sinal-ruído. Com esse método era possível analisar cerca de 100 amostras por dia em duplicata. Verificou-se, neste caso, que a correlação entre escatol e indol é grande e uma outra vantagem do método é o pequeno volume de solvente usado.

Garcia-Regueiro e Rius [26] em 1998 desenvolveram um método para análise de escatol e indol em toucinho de porco utilizando HPLC de fase normal e detector de fluorescência. Para análise, a gordura era extraída com uma mistura de hexano-2-propanol e agitação magnética por 30 minutos a temperatura ambiente. A solução era filtrada e $50 \mu\text{L}$ eram injetados no cromatógrafo. Com este procedimento de extração, a gordura não foi totalmente removida e pode-se perceber no cromatograma a eluição de triacilglicerídeos [26].

2.4.2 Androstenona

Para a determinação da androstenona já foram desenvolvidos métodos imunológicos, colorimétricos e cromatográficos. Um dos métodos imunológicos, desenvolvidos por Tuomola *et al.* em 1997 [23], utiliza fluoroimunescência resolvida no tempo. Eles aplicaram o método desenvolvido em gordura e plasma sanguíneo para relacionar as duas concentrações e verificar a possibilidade de realizar os ensaios em plasma pois nessa matriz não é necessária nenhuma etapa de extração. Para a análise em gordura, o método consistia em derretê-la em um microondas e transferí-la para um tubo contendo metanol e realizar a extração por 30 minutos a $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Após isso a amostra era resfriada e uma pequena porção do extrato metanólico era diluído num tampão. Eram adicionados os anticorpos que ficavam incubados por 1,5 horas e foram lavadas seis vezes com uma solução salina. Adicionava-se uma solução que continha o reagente fluorescente, o frasco era agitado e a fluorescência era

medida. A quantidade de solvente utilizada é reduzida em comparação com outros métodos imunológicos. No plasma não foi verificado se haveria reação com os metabólitos da androstenona, e seriam necessários mais estudos para se poder utilizar o método em plasma [23].

Os testes colorimétricos para determinação de androstenona são baseados na estabilidade da reação de esteróides com resorcilaldeído e ácido sulfúrico em ácido acético glacial. Squires, em 1990 [64], desenvolveu um método colorimétrico qualitativo para determinar esteróides androst-16-ene em glândulas salivares ou em toucinho de porco. No melhor método encontrado, as amostras de gordura eram homogeneizadas em metanol, centrifugadas para separação da gordura e do extrato metanólico, que eram decantados em um tubo com tampa. Neste tubo era adicionado uma solução de NaOH, extraído com hexano duas vezes e o extrato hexanóico obtido era seco sob fluxo de N₂. A solução de resorcilaldeído em ácido acético e uma solução de ácido sulfúrico em ácido acético eram adicionados e os tubos agitados, aquecidos a 100 °C por 10 minutos e a absorbância medida com um espectrofotômetro. Na gordura, os principais componentes que reagem com o resorcilaldeído são o colesterol e a androstenona, enquanto que nas glândulas salivares são o colesterol, 5 α -androst-16-en-3 α -ol e androstenona. O que permite a utilização deste método é que o comprimento de onda de máxima absorção do aduto formado pela androstenona e resorcilaldeído é 590 nm enquanto que a do aduto formado pelo colesterol e resorcilaldeído é 543 nm. Para reduzir o efeito do colesterol, as amostras sofreram separação em uma coluna contendo digitonin, que retirava o colesterol reduzindo a interferência deste composto. O método é mais específico para esteróides androst-16-ona que métodos colorimétricos desenvolvidos anteriormente [65]. Em 1993, o mesmo autor melhorou o método desenvolvido [66].

Vários métodos cromatográficos já foram desenvolvidos, mas diferentemente do escatol, os métodos para androstenona utilizam principalmente cromatografia gasosa. Thompson e Pearson em 1977 [15] utilizaram extração com solvente orgânico e várias etapas de limpeza das amostras, separação por GC-MS, utilizando modo de monitoramento de íons selecionados (SIM). Após a saponificação das amostras de toucinho com KOH, etanol e pirogalol, realizada sob refluxo por 35 minutos, as amostras eram transferidas para um funil de separação onde sofriam várias extrações líquido-líquido com hexano e eram

lavadas com água por 5 vezes. O solvente era evaporado e o resíduo diluído em acetato de etila. Para aumentar a seletividade do método, este extrato passou por uma separação em cromatografia em camada delgada preparativa. A faixa correspondente à androstenona foi retirada da placa e filtrada com solvente orgânico, que era evaporado posteriormente, o resíduo foi ressuspensionado e injetado no cromatógrafo. Este método apresentou um limite de quantificação de 50 ng g^{-1} , que é um limite de quantificação abaixo das concentrações normalmente encontradas, mas este método consome tempo e muitos reagentes, e a quantidade de amostras por dia é muito pequena.

Outro método que utilizou GC, só que com detecção por captura de elétrons (ECD) foi o método desenvolvido por Brabander e Verbeke em 1986 [16]. Eles contruíram um agitador para realizar estes experimentos. A gordura era colocada num frasco extrator com tolueno, KOH metanólico e solução de padrão interno, onde reagiam a $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Adicionava-se metanol, água e éter de petróleo, que eram agitados por 30 segundos e separados por centrifugação. O sobrenadante era transferido para outro frasco e o volume reduzido. O líquido resultante era transferido para outro frasco, o solvente evaporado e era adicionado o agente derivatizante, para permitir a detecção da androstenona pelo ECD, que ficaram em contato a 100°C durante 1,5 h. O resíduo obtido era ressuspensionado em ciclohexano e injetado. A faixa linear do método é $0,10 - 6,00 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$.

Já em 1995, Magard *et al.* [5] otimizaram e desenvolveram um método para quantificação de 5α -androst-16-en-3-ona e os álcoois 5α -androst-16-en-3 α -ol e 5α -androst-16-en-3 β -ol utilizando extração por fluido supercrítico e GC-MS. A gordura era derretida em um forno microondas e dopada com uma solução de padrão interno de 5α -androstan-3-ona para uma concentração de $1,0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, era então colocada na câmara de extração. A extração era realizada com CO_2 e antes da extração dinâmica, era realizada um passo de extração estática à temperaturas de $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de 329 bar, com posterior extração dinâmica. Na extração dinâmicas utilizou-se uma pressão de 115 bar à uma temperatura de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e o limite de detecção encontrado para a androstenona foi menor que as quantidades mínimas detectadas sensorialmente.

2.4.3 Escatol e Androstenona

Vários trabalhos publicados, relacionando as concentrações de escatol e androstenona ao *boar taint* utilizavam diferentes métodos para quantificar cada um dos analitos. Para diminuir o número de métodos utilizados criar um método de rotina para análise destes analitos, em 1994 foi desenvolvido o primeiro método para determinação de escatol, indol e androstenona em gordura de porco por Hansen-Møller [28]. Neste trabalho foi utilizado HPLC de fase reversa para separação e quantificação destes três analitos com detecção por fluorescência. A androstenona não possui fluorescência e por isso precisou ser derivatizada. À amostra era adicionado metanol e homogeneizado, sendo esta mistura sonicada por 5 minutos e resfriada em um banho de gelo por 15 minutos. Após a centrifugação uma parte do extrato era transferida para um *autosampler* e analisada. No *autosampler*, as amostras sofriam derivatização para tornar a androstenona visível ao detector de fluorescência. A 140 µL do extrato eram adicionados 30 µL de solução de dansilhidrazina dissolvida em metanol, 4,40 mL de água e 10 µL de BF₃ 20%. A reação ocorria em 5 min e a amostra era injetada em HPLC.

Posteriormente, outros métodos envolvendo os dois ou mais analitos foram desenvolvidos. Verheyden *et al.*, em 2007 [18], desenvolveram um método para quantificação de escatol, indol e androstenona em gordura de porco também por HPLC de fase reversa e detecção por espectrometria de massas de estágios múltiplos. Para a extração, à 10 g de amostra era adicionado padrão interno e 10 mL de metanol e essa mistura era homogeneizada em um digestor de amostras. A matriz gordurosa precipitou e o sobrenadante foi transferido para outro frasco, onde houve resfriamento com N₂ líquido e centrifugação a 6000 rpm por 5 minutos a baixa temperatura, permitindo a separação eficiente dos analitos dos componentes da matriz extraídos com o metanol. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e o extrato obtido era filtrado e, após diluição em solução 1% de ácido acético, era filtrado novamente. As amostras eram injetadas e para quantificação da androstenona utilizou-se o modo MS² relacionado aos íons produzidos enquanto que para os compostos indólicos utilizou-se os íons protonados no modo MS². Este método mostrou baixa repetibilidade para a androstenona sendo o coeficiente de variação

(CV) 33%, o que deve ser devido aos vários passos de extração. Os limites de quantificação obtidos para os analitos foram baixos.

Um método recentemente desenvolvido por Fischer *et al.*, em 2011 [62], é um método que utiliza análise por diluição em isótopo estável e extração por SPME através do headspace. Neste método foram analisados androstenona, 3 α -androstenol, 3 β -androstenol, escatol e indol. Para a extração, é adicionado à gordura o padrão dos isótopos, e é realizada uma etapa de extração com metanol, onde o tubo é agitado, centrifugado a baixa temperatura, o sobrenadante é retirado, seco sob fluxo de N₂ e a extração através do *headspace* é conduzida a 100°C, com fibra PDMS/DVB por 30 minutos.

2.5 Microextração em Fase Sólida

O ideal para analisar uma amostra é que não haja nenhum preparo desta, mas isso é praticamente impossível, tendo em vista os limites dos equipamentos e a grande complexidade das amostras. O preparo de amostras consiste num procedimento para isolar e enriquecer os componentes de interesse da matriz desejada [67] sendo necessário para melhorar o comportamento cromatográfico dos analitos, aumentar a detectabilidade e isolar os analitos das matrizes [68]. As técnicas de extração podem ser classificadas de acordo com seus princípios fundamentais de extração em pré-equilíbrio e em equilíbrio em sistemas de fluxo, extração em pré-equilíbrio e em equilíbrio em bateladas e extração exaustiva e não exaustiva em estado estacionário [67]. A SPME é uma técnica não exaustiva de batelada que se assemelha a técnicas de equilíbrio não exaustivas [67], sendo uma técnica de extração livre de solvente. A SPME vem sendo aplicada em amostras ambientais [69], biológicas [70] e de alimentos [71][72].

Técnicas de preparo de amostra livres de solvente têm sido desenvolvidas como *headspace*, SPME, *open tubular trapping*, extração sortiva por barra de agitação (SBSE), *gum-phase extraction* e todas as suas variações[69][73].

A SPME utiliza materiais sorventes como fase extratora e devido ao pequeno volume da fibra, possui grande capacidade de concentração dos analitos, além de o tempo de análise ser reduzido, pois extração e limpeza são realizados numa mesma etapa. A quantidade de analito extraída é diretamente proporcional à concentração do analito na

amostra e é independente do lugar em que a fibra é exposta [74]. Os materiais sorventes podem ser líquidos, como PDMS e PA ou de fases misturadas, como PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS e CAR/PDMS sendo que a massa molar do analito influencia na sua difusão no polímero, e portanto na sua extração [74]. Durante a extração por SPME é interessante que não haja solventes orgânicos presentes, pois estes saturam a fibra e impedem a adsorção do analito em cerca de 90% [74]. A extração pode ser direta, quando a fibra é colocada em contato direto com a amostra ou extração através do *headspace* quando a fibra é colocada em contato com o vapor em equilíbrio com a amostra. Pode-se ainda utilizar membranas durante o procedimento de extração direta onde apenas analitos com certo tamanho entrarão em contato com a fibra [76].

O princípio fundamental da termodinâmica que governa todas as técnicas de extração envolve a distribuição do analito entre a matriz e a fase extratora [67] e se a fase extratora é líquida essa constante é dada pela Equação 1.

$$K_{es} = a_e/a_s = C_e/C_s \quad (1)$$

onde a_e e a_s são respectivamente as atividades do analito na fase extratora e na matriz, que podem ser aproximadas pelas concentrações destes analitos (quando o coeficiente de atividade é próximo de 1). O K_{es} determina o fator de enriquecimento e a viabilidade do método de extração [67] e depende de diversos fatores como temperatura, pressão, pH, sal e concentração de compostos orgânicos [67].

Se a fase extratora é sólida, há adsorção e a equação 1 pode ser escrita como a equação 2,

$$K_{es}^s = S_e/C_s \quad (2)$$

onde S_e é a concentração dos analitos adsorvidos na superfície da fase extratora, que indica a área superficial do sorvente para adsorção que pode ser considerada [67].

Com as equações mostradas, pode-se calcular a quantidade de analito presente na fase extratora, quando se tem duas fases e a concentração do analito não varia na amostra. A expressão para o cálculo da deste quantidade pode ser descrita pela Equação 3,

$$n = K_{es}V_eC_s \quad (3)$$

onde V_e é o volume da fase extratora e C_s é a concentração do analito na matriz.

Em sorventes líquidos, a partição do analito para a fase extratora se dá pela solvatação do analito pelas moléculas do polímero, enquanto que para fibras sólidas, a estrutura cristalina reduz a difusão do analito para o interior da fibra, e a adsorção ocorre apenas na superfície dos poros [67]. Para o segundo tipo, quando se tem grandes tempos de extração e muitos interferentes, os analitos com baixa afinidade pela fibra serão deslocados dos sítios ativos por compostos com maior afinidade ou que estão presentes na amostra em maiores concentrações [67].

Já quando se trata de extração através do *headspace*, tem-se três fases em equilíbrio e não apenas duas. Se os analitos possuem altos valores da constante da Lei de Henry, o uso do *headspace* é interessante [67]. Para compostos com baixa volatilidade, a amostra pode ser aquecida para se aumentar a constante de Henry e induzir a convecção no *headspace* [67]. A extração através dos *headspace* tem a vantagem de reduzir a interferência de sólidos, óleos e outros componentes da matriz que podem incrustar na fibra, impedindo a extração dos analitos de interesse [75][76]. Teremos então três fases e como a quantidade de analito deve ser a mesma durante a extração podemos escrever a Equação 4,

$$C_0V_2 = C_1^*V_1 + C_2^*V_2 + C_3^*V_3 \quad (4)$$

onde C_0 é a concentração inicial do analito na solução, C_1^* , C_2^* e C_3^* são as concentrações de equilíbrio do analito na fibra, na solução aquosa e no *headspace* e V_1 , V_2 e V_3 são os volumes da fibra, da solução aquosa e do *headspace*. A quantidade de analito

extraída pela fibra pode ser escrita em função de constantes relacionadas a Lei de Henry para os analitos [77], como pode se observar pela Equação 5.

$$n = \frac{C_0 V_1 V_2 K}{V_1 K + V_3 K_2 + V_2} \quad (5)$$

onde K e K_2 estão relacionados com as constantes da lei de Henry. Após atingir o equilíbrio entre fase aquosa e *headspace* a fibra é inserida. Inicia-se o equilíbrio entre a fibra e o *headspace*, que é o processo de transferência do analito da fase gasosa para a fibra até atingirem o equilíbrio [75].

2.6 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente

Em GC, cerca de apenas 37% de picos de uma amostra complexa aparecem num cromatograma, ou seja em uma amostra com 100 compostos, sendo este valor menor que a capacidade de pico do sistema, apenas 37 picos aparecerão [78]. Isso acontece pois grande parte deles co-eluem, impossibilitando uma boa análise do cromatograma. Em amostras complexas, como derivados de petróleo, muitas vezes compostos de diferentes classes possuem pontos de ebulição próximos, o que acarreta coeluição destes em 1D-GC.

As separações em duas dimensões são mais eficazes que aquelas realizadas em apenas uma dimensão [79]. A GC×GC é uma técnica de separação multidimensional onde duas colunas são conectadas em série e todo o eluato da primeira coluna é fracionado e reinjetado na segunda coluna [79] através do modulador, que torna possível a separação bidimensional. Um esquema da configuração da GC×GC é mostrado na Figura 2.

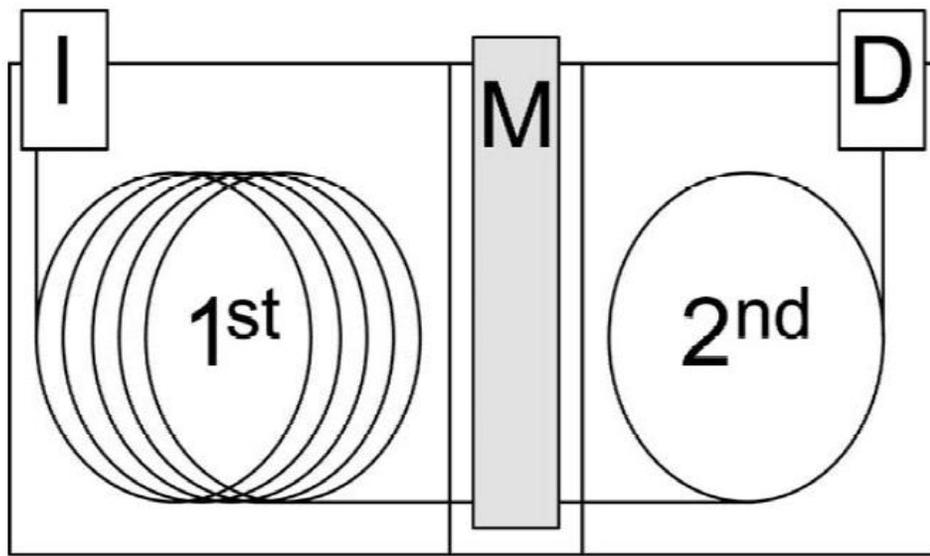


Figura 2: Esquema de um sistema de GCxGC: I, injetor, M, modulador, D, detector, 1st, forno de GC com a primeira dimensão, 2nd, forno de GC com a segunda dimensão.

Adaptado da referência [80].

Como a primeira dimensão (1^ª) é composta por uma coluna de GC típica, permite a aplicação dos diversos modos de injeção: split, splitless, on-column e large-volume [80]. As fases estacionárias mais utilizadas na primeira dimensão são 100% dimetilpolisiloxano ou 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano. Na segunda dimensão costuma-se utilizar uma coluna com alta polaridade com 35-50% fenileno-65-50% dimetilpolisiloxano, polietileno glicol (Carbowax), carborano (HT-8) e cianopropil-fenil-dimetilpolisiloxano [80].

Os picos em GCxGC tem larguras na ordem de 100 a 200 ms, e devido a isso, os detectores tem de possuir altas taxas de aquisição de dados, sendo o FID e o TOF-MS detectores indicados para este tipo de separação [79], podendo também serem usados detectores quadrupolares rápidos (qMS).

A primeira coluna alimenta a segunda com sub amostras que são relativamente simples e com volatilidades semelhantes, desde que a primeira dimensão seja apolar. A segunda coluna não precisa ter grande capacidade de pico, pois o número de componentes em cada cromatograma secundário é limitado e, além disso, não requer programação de temperatura pois as substâncias possuem volatilidade similares [79][80].

A separação na segunda dimensão (2D) deve ser muito mais rápida que a 1D , pois os tempos de modulação são pequenos. Se a separação na 2D não for rápida, a separação obtida na 1D será perdida [79]. As colunas utilizadas na 2D são colunas de *fast GC*, que são curtas, com diâmetro interno e espessura de filme menores que os convencionais, que possibilitam apenas a separação de misturas simples [79].

A interface que torna possível a GC×GC é o modulador, pois sem ele haveria apenas uma separação unidimensional com diferentes mecanismos de separação [79]. O modulador separa o eluato da 1D em pequenas frações que são reconcentradas e reinjetadas na 2D , o que diminui o alargamento das bandas na 2D .

Vários tipos de moduladores vêm sendo descritos na literatura, como moduladores por válvulas, moduladores térmicos e moduladores criogênicos. Os moduladores criogênicos foram desenvolvidos mais recentemente e as substâncias utilizadas para resfriamento geralmente são CO₂ ou N₂ líquido. Um modulador criogênico de quatro jatos e um esquema com o funcionamento desse modulador é mostrado na Figura 3.

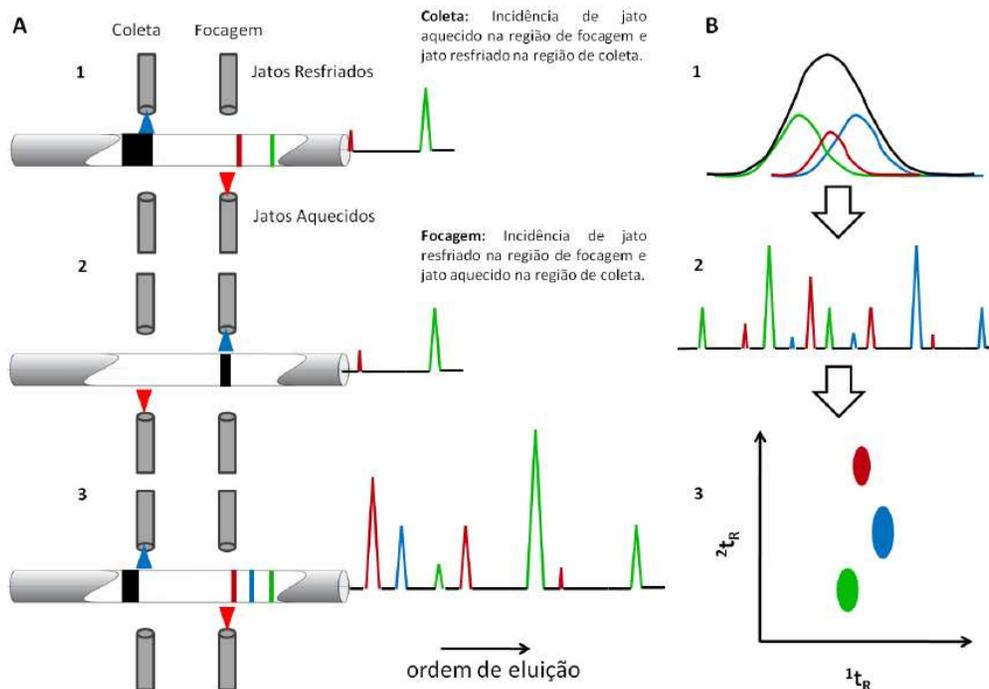


Figura 3: A-Ilustração do processo de modulação básica para um modulador de 4 jatos - 1. Etapa de coleta; 2. Etapa de focagem;3. Reinício do processo com eluição dos compostos retidos na focagem para a coluna. B – 1. Ilustração de um pico cromatográfico composto por 3 analitos coeluídos; 2. Ilustração dos picos cromatográficos modulados; 3. Visualização do cromatograma na forma de diagrama de contorno.

Figura retirada da referência [81].

Os mecanismos de separação das duas colunas devem ser diferenciados, para que haja uma maior magnitude da separação bidimensional [82], ou seja, para que se consiga uma melhor utilização do plano de separação. Quando há um alto grau de correlação nos mecanismos das duas colunas, a capacidade de separação bidimensional é reduzida, havendo alta correlação entre as retenções na primeira e segunda dimensões. Quando tem-se um conjunto de colunas normal, isto é uma coluna apolar na $1^{\circ}D$ e polar na $2^{\circ}D$, na primeira coluna a separação é por volatilidade e na segunda coluna a separação é por volatilidade e polaridade [82].

Na Figura 4–A, tem-se um conjunto normal de colunas. Ambas colunas estão em isoterma, e a amostra é uma série de compostos homólogos. Como esperado, o espaçamento entre os picos ao longo do cromatograma aumenta exponencialmente e a

largura do pico também aumenta, e observa-se a correlação nos tempos de retenção, pois aqui o mecanismo que governa a separação é a volatilidade. Na Figura 4-B, tem-se a primeira coluna sob isoterma e a segunda coluna é submetida a programação de temperatura, e pode-se observar que já não há mais correlação pois a programação de temperatura eliminou a volatilidade da segunda coluna e apenas as interações específicas governam a separação (série homóloga com mesmo tempo de retenção na ²D). Ao se colocar também a ¹D sob programação de temperatura, observa-se o cromatograma dado em Figura 4-C, onde verifica-se que as distâncias entre os compostos na ¹D é a mesma e que na ²D a retenção é também a mesma, mostrando, como no caso anterior presença apenas da separação por polaridade. Na prática há desvios na retenção de compostos homólogos na ²D, que são principalmente devido à variação da viscosidade do gás de arraste com a temperatura [79].

Já na Figura 4-D, foi adicionado mais duas séries homólogas às amostras e com ajuste adequado, a ¹D separa por volatilidade e a ²D são separa por interações específicas. Aumentando a temperatura, a retenção na segunda coluna é diminuída e compensa a diminuição da volatilidade das substâncias eluindo da primeira coluna [79]. Dessa forma, as séries homólogas serão separadas na ²D pelas interações específicas com a fase estacionária [79]. A retenção na segunda coluna é relacionada com a retenção na primeira, pois se as interações na primeira coluna são fortes, os compostos eluirão numa temperatura maior e serão menos retidos na ²D .

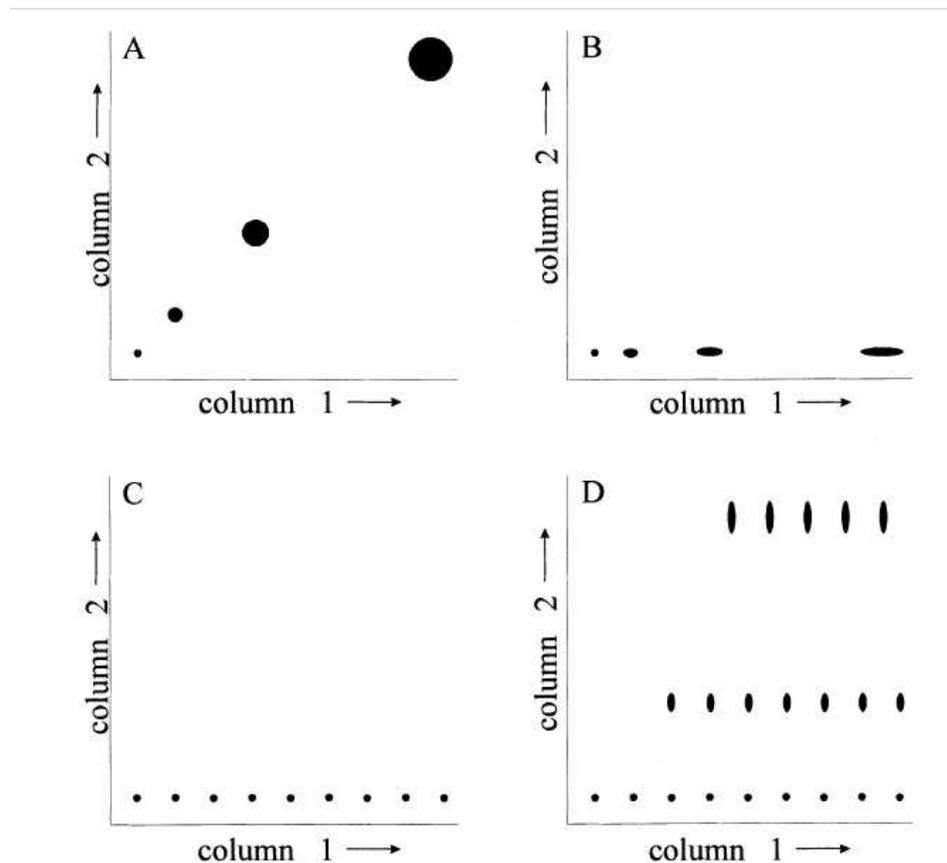


Figura 4: Uso da programação de temperatura para gerar um cromatograma ortogonal em cromatografia gasosa bidimensional.

Adaptado da referência [79].

Uma grande vantagem das técnicas multidimensionais, como a GC×GC, é a grande capacidade de pico. A capacidade de pico de um sistema é definida como a quantidade máxima de picos de uma amostra com dimensionalidade 1 (por exemplo série de n-alcenos) que podem ser completamente resolvidos em uma única corrida [83]. A capacidade de pico mínima que uma coluna deve apresentar para resolver os constituintes de uma amostra de dimensionalidade 1 com 100 picos será 100 [83]. Para uma amostra complexa, de dimensionalidade maior do que 2, de 100 constituintes será necessário uma capacidade de pico mínima de 10.000, ou equivalentemente um aumento de 10.000 vezes no número de pratos teórico. A capacidade de pico de um cromatograma em GC×GC, em teoria, é igual ao produto da capacidade de pico das duas colunas, sendo igual a $n_1 \times n_2$. Na Figura 5 pode-se

observar a diferença da capacidade de pico da GC convencional, GC-GC e GC×GC, onde observa-se um valor muito maior para a GC×GC.

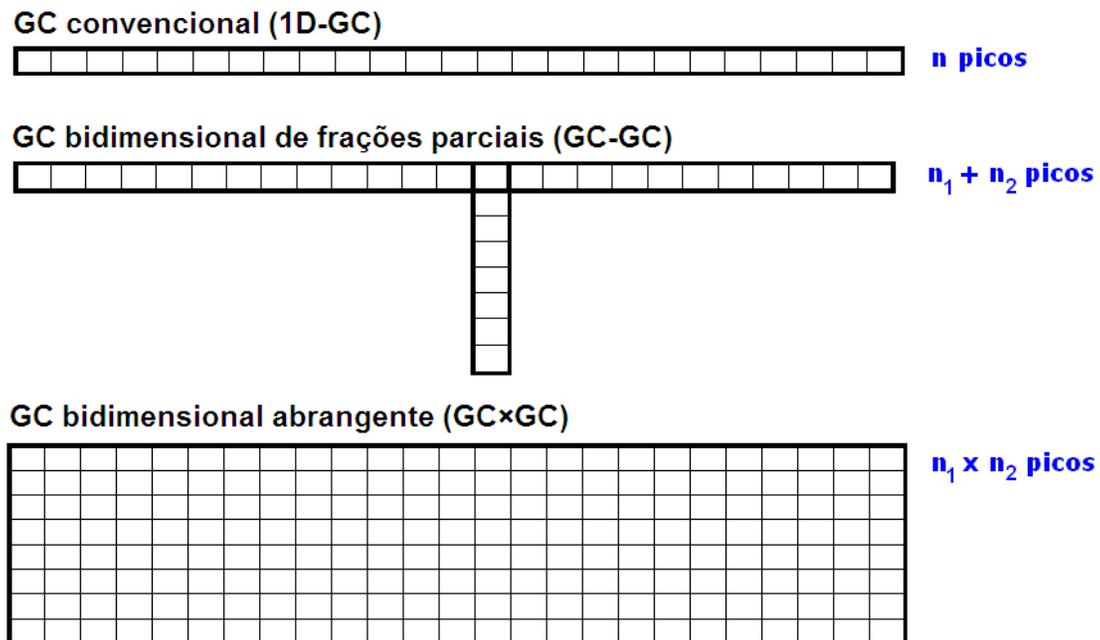


Figura 5: Comparação da capacidade de picos para 1D-GC, GC-GC para a transferência de uma fração e para GC×GC.

Figura retirada da referência [81]

Uma ferramenta de técnicas cromatográficas bidimensionais é a estrutura cromatográfica, onde compostos quimicamente semelhantes se agrupam, facilitando a indentificação visual, permitindo maior rapidez e confiabilidade na identificação.

Na Figura 6, pode ser observado o agrupamento de compostos quimicamente semelhantes no diagrama de cores de uma fração de petróleo.

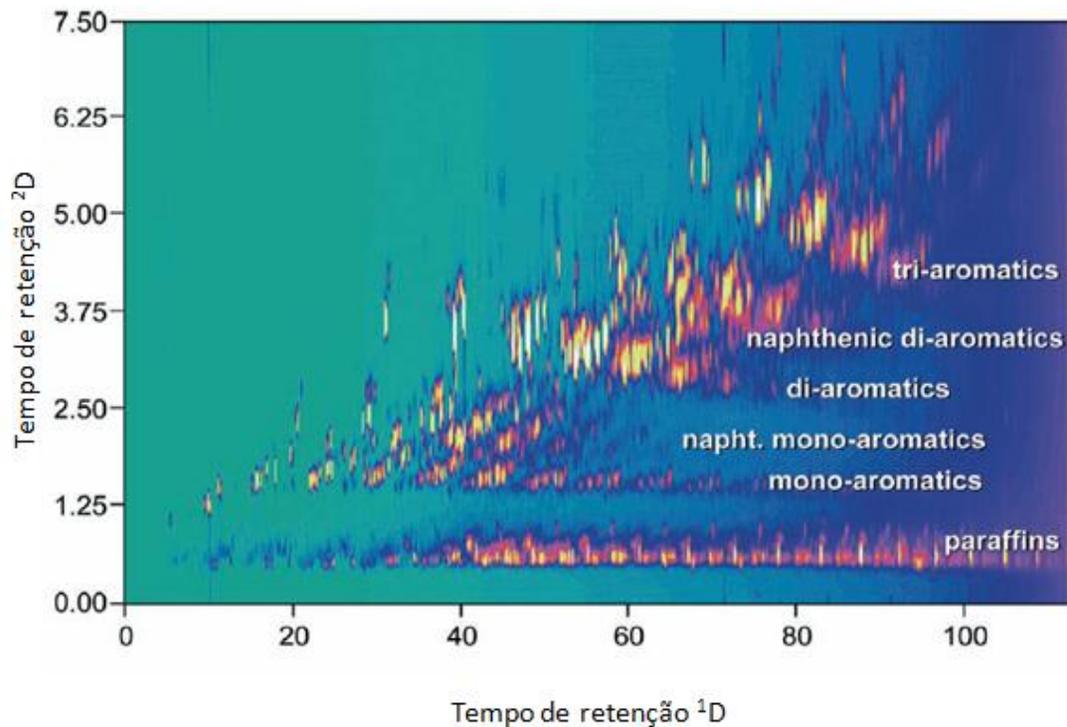


Figura 6: Cromatograma mostrando a estruturação cromatográfica de uma amostra de fração de petróleo. Conjunto de colunas 25 m x 0,25 mm d.i. DB-1 x 1,5 m, 0,1 mm d.i. OV-1701. Adaptado da referência [80].

2.7 Otimização Multivariada: Planejamento Doehlert

O uso de técnicas multivariadas em planejamentos experimentais tem se tornado mais frequente em química analítica, assim como em outras ciências, e se baseia no estudo simultâneo de diversas variáveis, o que faz com que o tempo para se obter resultado seja menor, além de ser mais efetivo que planejamentos univariados [84]. No planejamento multivariado é possível verificar se há interações entre as variáveis, ou seja se a mudança de nível de duas variáveis ao mesmo tempo pode aumentar ou diminuir a resposta mais do que se apenas uma delas variar.

O planejamento Doehlert foi apresentado em 1970 por David H. Doehlert [85] e é uma alternativa interessante aos planejamentos de segunda ordem. O planejamento Doehlert

possui vantagens em relação ao planejamento de composto central e Box-Blenken pois necessita de menos experimentos, o que promove maior eficiência [84], além de avaliar mais níveis das variáveis atribuídas como mais importantes [86]. Uma característica importante deste é que as variáveis são avaliadas entre 3 e 7 níveis sendo as mais importantes estudadas em mais detalhes, além de ser necessário menos experimentos comparando-se com o planejamento de composto central [86].

O Planejamento Doehlert possui um domínio circular para duas variáveis, esférico para três e hiperesférico para mais de quatro variáveis e isto acentua a uniformidade no espaço envolvido. As matrizes Doehlert não são ortogonais nem rotacionais, mas para, por exemplo, duas variáveis a matriz consiste em um ponto central e seis pontos que formam um hexágono [84][86].

Os planejamentos são definidos considerando o número de variáveis e os valores codificados da matriz experimental. A relação entre valores experimentais e os valores codificados é dado pela equação 6.

$$X_i = \left\{ \frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \right\} \beta_d \quad (6)$$

onde X_i é o valor codificado para o nível do fator i , Z_i é o valor experimental, ΔZ_i é a distância entre o valor experimental no ponto central e o experimental no nível superior ou inferior, β_d é o maior valor codificado para cada fator, e Z_i^0 é o valor experimental no ponto central.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando Planejamento Doehlert [84][87], mas este número ainda é pequeno comparando-se com outros planejamentos, como o planejamento composto central.

Capítulo 3:

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método para detecção, identificação e quantificação de androstenona e escatol em toucinho de porco por GC×GC utilizando SPME como método de purificação, o qual é rápido e eficiente para posterior análise de amostras de rotina. Os objetivos específicos deste trabalho estão descritos a seguir.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Otimizar as condições cromatográficas em GC convencional para determinar androstenona e escatol em toucinho de porco,
- ✓ Otimizar as condições cromatográficas em GC×GC para androstenona e escatol em toucinho de porco,
- ✓ Desenvolver o método de extração utilizando SPME,
- ✓ Validar o método desenvolvido por GC×GC-qMS,
- ✓ Aplicar o método desenvolvido em amostras de toucinho.

Capítulo 4:

Materiais e Métodos

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho as amostras de toucinho foram obtidas do ITAL. A amostra escolhida para otimização obteve negativo em testes sensoriais para androstenona e escatol. Os reagentes utilizados, androstenona (99%) e escatol (98%), assim, como as fibras PDMS (polidimetilsiloxano) com espessura de filme de 100 μm , DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno, carboxen, polidimetilsiloxano) com espessura de filme de 50/30 μm e 2 cm e PDMS/DVB (polidimetilsiloxano, divinilbenzeno) com espessura de filme 65 μm , foram obtidos da Sigma-Aldrich e o metanol grau HPLC foi adquirido da Tedia. Foram preparados soluções estoque contendo escatol e androstenona em concentrações de 150 mg L^{-1} , utilizadas no procedimento de otimização do método. Além dos reagentes, utilizou-se banho termostaticado, agitador magnético e balança analítica. Os cromatógrafos utilizados foram um HP 6850 com detector de FID e um Shimadzu QP2010 plus com detector espectrométrico de massas com analisador quadrupolo. O software comercial GCMSsolution versão 5.3 foi utilizado na aquisição de dados de GC \times GC-MS, o software Agilent Chemstation foi utilizado na aquisição de dados e GC-FID e GC \times GC-FID e o controle do sistema GC \times GC foi baseado na plataforma LabView® versão 8.5 onde foi utilizado o conversor AD/DA NI USB6009 de 14 bits da National Instruments. A análise dos cromatogramas de GC \times GC foi realizada com o software GC Image versão 2.0.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo de amostras

Para utilizar o toucinho nas análises, era necessário que esta amostra estivesse em uma forma que pudesse ser pesada e mais próxima da homogeneidade. Para isso, o toucinho foi triturado em um liquidificador de laboratório, onde a pele era retirada, o toucinho era cortado em cubos e congelado com N_2 líquido. As amostras eram homogeneizadas e

armazenadas em frascos de vidro em freezer a -10°C até o momento das análises. Todo o desenvolvimento do método e validação foram desenvolvidos com amostras fortificadas.

4.2.2 Condições cromatográficas

Na determinação das condições cromatográficas que melhor separassem os analitos de interesse dos diversos componentes da matriz, iniciou-se o trabalho utilizando as condições apresentadas no trabalho de Magard *et al.* [5] e, com algumas modificações do método, obteve-se a separação dos analitos e aparente eliminação de interferências. As condições utilizadas em GC-FID para otimização do método foram coluna de sílica fundida HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), temperatura do injetor 250°C e temperatura do detector 250°C . A temperatura da coluna era mantida a 100°C por um minuto e com aumento de $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até uma temperatura de 300°C , na qual permanecia por 1 minuto. O gás de arraste utilizado durante a otimização do método foi o He a uma vazão de $1,00\text{ mL min}^{-1}$. A validação e aplicação do método foi conduzida em GCxGC e novas condições tiveram que ser determinadas. Dessa forma, otimizou-se as condições para GCxGC-FID e GCXGC-qMS (cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detecção por espectrometria de massas com analisador quadrupolo) como período de modulação, % de frio na coleta e quente na focagem e foram feitas algumas modificações na programação de temperatura. As condições utilizadas nas análises eram set de colunas HP-5 (5% de fenil-polidimetilsiloxano), coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm, 0,25 mm) + DB-Wax (Polietilenoglicol-PEG) coluna (1 m x 0.1 mm, 0.1 mm), operado nas condições: temperatura do injetor 250°C ; temperatura da coluna: isoterma a 100°C por 1 min, aquecida a $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 240°C e isoterma a 240° por 12 minutos; utilizando H_2 como gás de arraste a uma vazão de $0,6\text{ mL min}^{-1}$. O período de modulação era 6 s, as condições do espectrômetro de massas eram: temperatura da interface 270°C , temperatura da fonte de íons 270°C , ionização por impacto de elétrons a 70 eV, monitoramento dos íons de m/z 77, 103, 130, 131 até 9 min (escatol) e 239 e 272 de 9 até 20 min. (androsteno). Estas foram as condições que mostraram melhor relação sinal-ruído para os dois analitos.

4.2.3 Determinação dos índices de retenção da androstenona e do escatol

Os índices de retenção obtidos em cromatografia gasosa são feitos comparando-se a quantos átomos de C_{12} haveriam num determinado composto se ele fosse um alcano, sendo este calculado pelo tempo de retenção do analito e dos alcanos anterior e posterior a eluição deste. Conhecido também como índice de Van Den Dool [88], é muito utilizado para identificação de compostos, juntamente com outras informações qualitativas, como o espectro de massas. Assim, para se obter maior confiabilidade na identificação de androstenona e escatol em toucinho de porco, optou-se por determinar o índice de retenção desses dois analitos quando extraídos por SPME e comparar os índices obtidos no equipamento com detecção por FID e MS, onde o analisador era do tipo quadrupolo com uma faixa de 40-400 m/z. Para isso, extrairam-se amostras de toucinho dopadas com 50 μ L de solução de escatol e androstenona em concentrações de 150 mg L⁻¹ por SPME. Após a extração, a fibra foi exposta em um *vial* contendo padrão de alcanos C_7 - C_{40} por 10 minutos. A fibra era dessorvida no injetor do cromatógrafo por 5 minutos sob as condições determinadas no item 4.2.2. A injeção foi realizada nos equipamentos de GC-FID e GC-qMS, para confirmação do pico dos analitos.

4.2.4 Preparo da amostra para extração

Com a finalidade de diminuir o efeito de matriz e aumentar a constante de distribuição dos analitos entre *headspace*-amostras, tentou-se preparar uma suspensão de toucinho em água, e para isso pesaram-se 3,000 g da amostra triturada, à qual era adicionado 1,00 mL do surfactante Triton X-100 e cujo volume foi completado com água deionizada em um balão volumétrico de 50 mL. Este balão foi levado ao ultrassom por meia hora na tentativa de dispersar a gordura uniformemente. Testaram-se também outras formas de preparo de amostra, que incluíram toucinho triturado pesado diretamente no *vial* extrator de fundo cônico e toucinho saponificado. Para este, pesava-se 0,150 (\pm 0,001) g de amostra e adicionava-se 0,50 mL de solução saponificante (KOH, Na_2CO_3) ou ainda 0,108 g de CH_3ONa . Procedia-se a reação à temperatura de 80 °C, neutralizando-se o meio ou não ao fim do processo. Quando se testava as soluções a reação era realizada no próprio *vial* extrator e para o

CH₃ONa, a reação era realizada em outro vial e após neutralização era transferida para o vial extrator. Procedia-se a extração por SPME com uma fibra DVB/CAR/PDMS no *headspace* por 30 minutos e a análise era realizada por GC-FID. As áreas dos picos das amostras, desenvolvidas em triplicata, foram medidas e realizou-se a comparação entre os métodos de preparo.

4.2.5 Determinação da fibra extratora

Após a determinação da forma de preparo de amostra, procedeu-se ao processo de extração com diferentes fibras para se determinar qual recobrimento seria mais adequado para os analitos de interesse, sendo os recobrimentos testados PDMS 100 µm, PDMS/DVB 65 µm e DVB/CAR/PDMS 50/30 µm, onde os ensaios eram realizados em triplicata nas mesmas condições experimentais. Para isso, pesava-se 0,150 (± 0,001) g de toucinho no *vial* extrator, onde adicionava-se 0,50 mL de solução saponificante. A reação era desenvolvida por 30 minutos, neutralizava-se posteriormente com 0,50 mL de solução de HCl 4,00 mol L⁻¹ e expunha-se cada fibra por 30 minutos no *headspace*. As fibras foram dessorvidas no injetor do cromatógrafo HP 6850 com detecção por FID. A comparação entre as fibras se deu pelas áreas dos picos obtidas para escatol e androstenona.

4.2.6 Planejamento Experimental Doehlert

O planejamento experimental multivariado é interessante pois além de ser mais rápido, pode-se descobrir a interação de variáveis na resposta, o que não é possível quando se utiliza otimização univariada. Durante os testes dos itens anteriores, verificou-se que os fatores tempo de extração, temperatura de extração, tempo de derivatização e concentração da solução derivatizante eram relevantes na extração dos analitos. Com estes parâmetros realizou-se um planejamento experimental Doehlert com as fibras PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS, que se destacaram no item 4.2.5.. Realizou-se um planejamento com quatro variáveis para a fibra de PDMS/DVB, como mostrado na Tabela 1. Avaliaram-se os tempos de saponificação e de extração, a temperatura de extração e a concentração de KOH, sendo o primeiro parâmetro avaliado em 5 níveis, o segundo e o terceiro em 7 níveis e

o quarto parâmetro avaliado em 3 níveis. Com os melhores tempos de saponificação e concentração de solução saponificante, realizou-se um planejamento com tempo e temperatura de extração utilizando a fibra DVB/CAR/PDMS, mostrado na Tabela 2. Esses planejamentos foram realizados com réplicas apenas no ponto central, onde realizaram-se 5 medidas com variação dos parâmetros do planejamento, sendo fixas a massa da amostra em 0,15 g, o volume de derivatizante de 0,50 mL e o tempo de dessorção da fibra no injetor de 5 minutos. Essas análises foram feitas por GC-FID e após a obtenção das áreas utilizou-se o software STATISTICA 7.0 para analisar o planejamento desenvolvido.

Tabela 1: Valores codificados e experimentais (entre parênteses) para o planejamento Doehlert com quatro variáveis para a fibra PDMS/DVB.

Tempo de saponificação /min.	Temperatura de extração /°C	Tempo de extração /min	Concentração de KOH/ molL ⁻¹
0(30)	0(60,0)	0(30,0)	0(4,0)
1(45)	0(60,0)	0(30,0)	0(4,0)
0,5(37,5)	0,866 (80,0)	0(30,0)	0(4,0)
0,5 (37,5)	0,289(66,7)	0,817(45,0)	0(4,0)
0,5 (37,5)	0,289 (66,7)	0,204 (33,7)	0,791(5,0)
-1(15,0)	0(60,0)	0(30,0)	0(4,0)
-0,5 (22,5)	-0.866(40,0)	0(30,0)	0(4,0)
-0,5 (22,5)	-0,289(53,3)	-0,817 (15,0)	0(4,0)
-0,5 (22,5)	-0,289 (53,3)	-0,204 (26,2)	-0,791(3,0)
0,5 (37,5)	-0.866 (40,0)	0(30,0)	0(4,0)
0,5 (37,5)	-0,289 (53,3)	-0,817 (15,0)	0(4,0)
0,5 (37,5)	-0,289 (53,3)	-0,204 (26,2)	-0,791 (3,0)
-0,5 (22,5)	0,866(80,0)	0(30,0)	0(4,0)
0(30,0)	0,577 (73,3)	-0,817 (15,0)	0(4,0)
0(30,0)	0,577 (73,3)	-0,204 (26,2)	-0,791 (3,0)
-0,5(22,5)	0,289 (66,7)	0,817 (45,0)	0(4,0)
0(30,0)	-0,577(46,7)	0,817 (45,0)	0(4,0)
0(30,0)	0(60,0)	0,613(41,2)	-0,791 (3,0)
-0,5(22,5)	0,289 (66,7)	0,204 (33,7)	0,791 (5,0)
0(30,0)	-0,577(46,7)	0,204 (33,7)	0,791 (5,0)
0(30,0)	0(60,0)	-0,613(18,7)	0,791 (5,0)
0(30,0)	0(60,0)	0(30,0)	0(4,0)
0(30,0)	0(60,0)	0(30,0)	0(4,0)
0(30,0)	0(60,0)	0(30,0)	0(4,0)
0(30,0)	0(60,0)	0(30,0)	0(4,0)

Tabela 2: Valores codificados e experimentais(entre parênteses) para o planejamento Doehlert com duas variáveis para a fibra DVB/CAR/PDMS.

Temperatura. de extração/°C	Tempo extração /min.
0(60)	0(30)
1(80)	0(30)
0,5(70)	0,866(45)
-1(40)	0(30)
-0,5(50)	-0,866(15)
0,5(70)	-0,866(15)
-0,5(50)	0,866(45)
0(60)	0(30)
0(60)	0(30)
0(60)	0(30)
0(60)	0(30)

4.2.7 Validação do método

Os parâmetros de validação avaliados durante o desenvolvimento deste trabalho foram linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão. O intuito da validação é avaliar a aplicabilidade e confiabilidade do método e quais são as concentrações em que este método pode ser utilizado. As normas utilizadas para a validação foram as normas da FDA (*Food and Drugs Administration*) [89]. Na avaliação da linearidade, as amostras foram dopadas com diferentes quantidades de solução estoque de escatol e androstenona, gerando para o escatol concentrações que variavam de 0,05 a 0,35 $\mu\text{g g}^{-1}$ e para a androstenona 0,50 a 10,00 $\mu\text{g g}^{-1}$. As amostras passaram pelo processo de extração otimizado e foram analisadas por GC \times GC-qMS. Após a obtenção das áreas, plotou-se a curva de calibração utilizando o programa ORIGIN 8.0 e, após encontrar para cada analito o coeficiente de correlação R satisfatório, com as equações e erros das curvas analíticas determinadas, pode-se calcular os limites de detecção e de quantificação.

A precisão do método foi avaliada pela repetitividade e precisão intermediária. Para a repetitividade, foram realizadas sete repetições em um mesmo dia, nas mesmas concentrações com posterior análise do coeficiente de variação. Para a precisão

intermediária, em dois dias diferentes analisou-se sete amostras fortificadas da mesma forma e verificou-se se os valores encontrados para estas diferiam significativamente ou não.

Para avaliação da exatidão, foram realizadas no mesmo dia triplicatas em três diferentes concentrações, avaliando-se o erro absoluto entre as concentrações encontradas pela curva e a concentração em que as amostras foram fortificadas.

4.2.8 Análise de Amostras

Em amostras onde havia interesse em se conhecer as concentrações de androstenona e escatol, o método desenvolvido foi aplicado e as concentrações de escatol foram determinadas, além da determinação da presença ou não da androstenona.

Capítulo 5:

Resultados e Discussão

5 Resultados e Discussão

Aqui serão relatados e discutidos todos os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho. Primeiramente serão discutidos os resultados da otimização das condições cromatográficas e a otimização univariada dos fatores qualitativos deste trabalho. Serão discutidos ainda os resultados e as implicações da otimização multivariada dos parâmetros de extração quantitativos. A seguir, serão mostradas as etapas da validação do método com todas figuras de mérito avaliadas e a efetividade do método desenvolvido. Posteriormente será mostrado a aplicação do método desenvolvido em algumas amostras de toucinho e a vantagem deste em relação a outros métodos já desenvolvidos.

5.1 Condições cromatográficas em GC convencional e Índices de retenção

As condições cromatográficas obtidas de Magard *et al.* [5] foram a base para as condições cromatográficas em GC-FID utilizadas. Com algumas modificações nas temperaturas do injetor e detector, essas condições se mostraram satisfatórias na separação unidimensional dos analitos, sendo determinadas no cromatógrafo HP 6850. As condições que se adequaram à separação dos analitos foram: coluna HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) sendo o equipamento operado nas condições: temperatura do injetor 250° C; temperatura da coluna: 100° C (1 min) → 20 °C min⁻¹ → 300 °C (1 min); temperatura do detector 250°C, utilizando He como gás de arraste a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. A utilização da coluna HP-5, uma coluna tipicamente apolar, se mostrou adequada e portanto não foi necessário o estudo de outras colunas para a separação desta amostra. Devido aos muitos componentes da amostra e a grande diferença na temperatura de ebulição dos analitos, a programação linear de temperatura foi necessária. Esta deve ser utilizada quando os compostos de interesse possuem temperaturas de ebulição muito diferentes pois, se fosse feito o uso de uma isoterma o tempo de análise se estenderia e provocaria alargamento da banda dos compostos mais retidos [90]. Para determinação de quais picos eram dos analitos de interesse, houve a extração de uma amostra isenta destes analitos e essa mesma amostra

fortificada com solução destes e após a comparação dos cromatogramas, verificou-se os tempos de retenção dos analitos, pela presença de dois picos na amostra dopada.

Mesmo fazendo a fortificação da amostra, houve a necessidade de mais um parâmetro para confirmação dos picos dos analitos. Devido ao pequeno número de informações sobre estes analitos, inclusive a não obtenção dos índices de retenção na literatura, calculou-se os índices desses analitos num cromatógrafo equipado com detecção por espectrometria de massas e comparou-se com os índices obtidos no equipamento de GC-FID utilizado. Os índices de retenção obtidos foram calculados pela equação 7 e na Tabela 3 são mostrados os índices de retenção obtidos nos dois equipamentos.

$$I = 100 \times M + \frac{100 \times x(t_x - t_m)}{t_{m+1} - t_m} \quad (7)$$

Tabela 3: Índices de retenção para androstenona e escatol nos equipamentos com detecção por FID e por espectrometria de massas.

Equipamento	Androstenona	Escatol
GC-FID	2344	1403
GC-MS	2334	1408

Para confirmação dos picos dos analitos por espectrometria de massas, comparou-se os espectros de massa obtidos para os picos destes com espectros da biblioteca NIST, e como a similaridade era maior que 90% pode-se obter confiabilidade nos índices obtidos. Pode-se observar que os índices de retenção obtidos para a androstenona e o escatol em ambos equipamentos estão em concordância mostrando, com uma grande confiabilidade, juntamente com os dados de espectrometria de massas, que os picos avaliados correspondem aos analitos de interesse.

5.2 Otimização Univariada

Com a confirmação dos picos dos analitos, partiu-se para a etapa de otimização do método. Para isso, optou-se por otimizar o tipo de preparo de amostra e tipo de fibra utilizando o método univariado pois estes dois parâmetros são qualitativos e não seria possível fazer uma otimização de segunda ordem com eles. Para otimizar o preparo de amostras para extração, houve a tentativa de preparo de uma suspensão utilizando o surfactante Triton X-100, que foi sonicada durante 30 minutos, na tentativa de uma melhor dispersão da gordura em água. Mesmo utilizando o surfactante e a agitação sob ultrassom, não foi possível obter uma suspensão em que poderia-se ter repetitividade na pipetagem desta, o que tornou este preparo não satisfatório para os fins desejados.

Uma forma mais simples de se realizar a extração por SPME seria a utilização do toucinho na forma triturada. Após diversas tentativas de utilização da amostra pura, a baixa repetitividade nas áreas obtidas e a baixa intensidade destas para o escatol, e a não visualização do pico correspondente à androstenona em algumas amostras, mostrou que não seria viável utilizar esta forma de preparo para o método proposto. Na Tabela 4 são mostradas as áreas encontradas para triplicatas extraídas nas mesmas condições com a fibra DVB/CAR/PDMS.

Tabela 4: Áreas medidas para escatol e androstenona nas mesmas condições de extração e fibra DVB/CAR/PDMS e mesmas concentrações em toucinho puro.

Área Escatol	Área Androstenona
63,0	32,7
340,0	134,0
43,5	5,8

Uma outra alternativa verificada em vários trabalhos seria a saponificação do toucinho. Na reação de saponificação, triacilglicerídeos são hidrolisados, formando sais de ácidos graxos. Após a neutralização da solução, tem-se a formação dos ácidos graxos. Desta maneira, os glóbulos de gordura existentes no toucinho são quebrados, podendo aumentar a dissolução dos analitos, assim como a dissolução de vários outros compostos. Com a

dissolução destes compostos, embora haja maior possibilidade de co-eluição e haver mais componentes competindo por sítios ativos no processo de extração [66], a quantidade dos analitos em solução aumenta, favorecendo a extração destes.

Como escolha de saponificantes, optou-se por KOH, por ser utilizado em outros trabalhos com estes analitos, CH₃ONa, por ser um saponificante utilizado na determinação de ácidos graxos em amostras biológicas [81] e Na₂CO₃, com o intuito de encontrar uma outra alternativa para estes procedimentos.

Para todos os saponificantes, a concentração de sítios básicos utilizados era a mesma. Para determinar a concentração de saponificante que deveria ser utilizada, consultou-se o índice de saponificação do toucinho, que é a quantidade de KOH (em gramas) que deve ser utilizada para completa saponificação de 1000 g de amostra. Como o índice de saponificação desta amostra é 138 [91], calculou-se a concentração de KOH que deveria ser utilizada para um volume de 0,50 mL, que é de 1,0 mol L⁻¹, e utilizou-se um excesso de 3 vezes para garantir completa saponificação das amostras. Antes de iniciar a extração de amostras, testou-se a viabilidade da saponificação para os três reagentes e para todos eles a inspeção visual demonstrava o mesmo grau de dissolução da gordura. Devido a maior viscosidade da solução de Na₂CO₃ observada, o que pode afetar a transferência de massa dos analitos para o *headspace*, diminuindo a extração destes, optou-se por não continuar com este reagente.

Os testes foram realizados apenas com o KOH e CH₃ONa. Para os dois saponificantes, amostras fortificadas com mesmas concentrações (10,0 µg g⁻¹ de cada um dos analitos) sofriam reação de saponificação, eram neutralizadas ou não com solução de HCl em mesma concentração, e para que não houvesse influência da diferença de concentração dos analitos em solução e nem diferença na extração pela diferença de volume de *headspace*, nas amostras não neutralizadas era adicionado 0,50 mL de água deionizada. Na Figura 7 pode-se visualizar uma amostra de toucinho saponificada com solução de KOH, neutralizada e não neutralizada. Pode-se observar que quando a solução não é neutralizada temos apenas uma fase, contendo sais de ácidos graxos (sabão), e quando a amostra é neutralizada, observa-se a separação dos ácidos graxos da solução aquosa.



Figura 7: Foto ilustrando a diferença visual entre amostra de toucinho saponificada sem neutralização (esquerda) e amostra saponificada e neutralizada (direita).

Quando se utilizava CH_3ONa sem neutralização várias bolhas se formavam devido à agitação, ocupando totalmente o *vial* e impedindo a extração destas amostras através do *headspace*. As áreas e desvios padrão obtidos na avaliação de preparo de amostra são mostrados na Figura 8. Pode-se observar que as maiores áreas, tanto para o escatol quanto para a androstenona foram obtidos como o uso de solução de KOH com posterior neutralização.

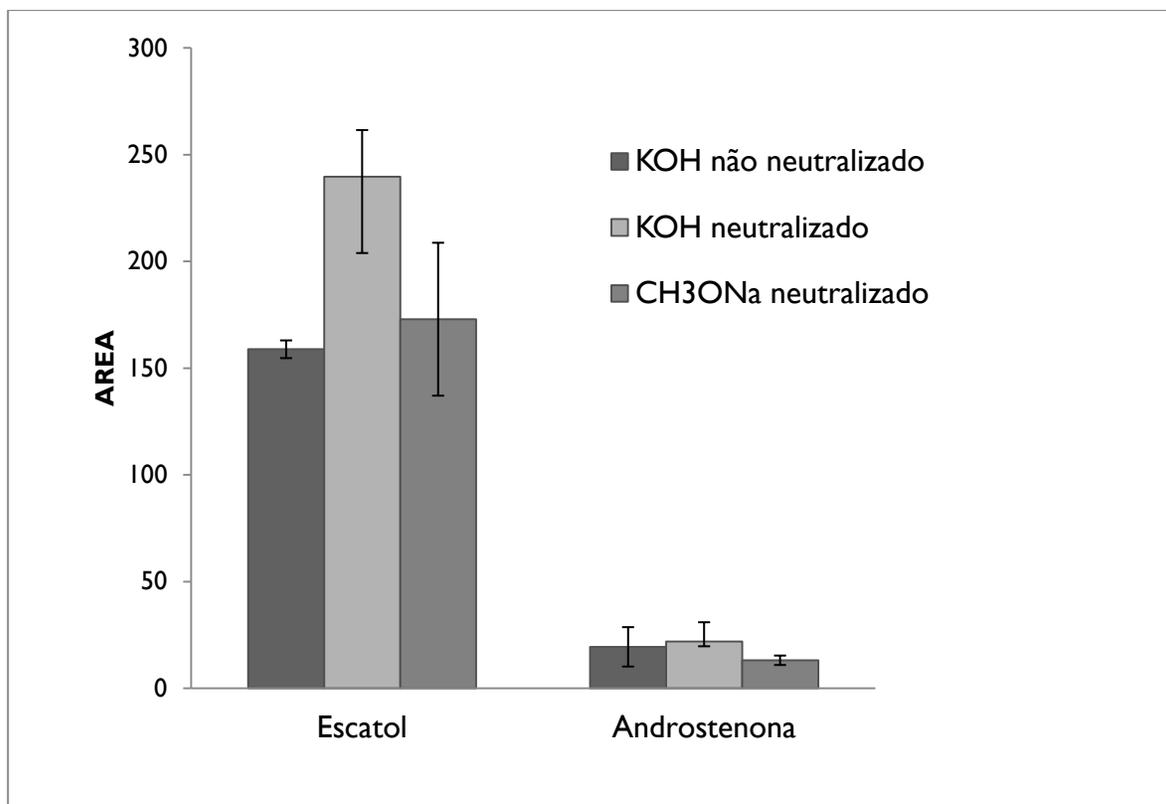


Figura 8: Área de pico obtida em função do tipo de preparo de amostra para os dois analitos, utilizando a fibra DVB /CAR/PDMS.

Uma maior recuperação foi obtida a utilização da solução de KOH, o que pode ter ocorrido devido perda dos analitos por reação com CH_3ONa . A menor quantidade extraída com o CH_3ONa pode também ser atribuída à formação de metanol após a saponificação, o que desfavorece a distribuição dos analitos para o *headspace*, diminuindo a quantidade extraída pela fibra. Bradanber e Verbeke em 1986 [16] reportaram uma perda de androstenona devido à saponificação, utilizando KOH. Nesse trabalho, o preparo de amostra que forneceu melhores resultados foi a utilização de KOH com posterior neutralização.

Vários autores saponificaram a gordura antes do procedimento de extração e todos utilizaram KOH ou NaOH em metanol [15][16][17][18][19][26]. Garcia-Regueiro e Diaz, em 1989 [17], compararam a extração em amostra saponificada e pura, e a amostra saponificada teve resultados inferiores, devido a maior facilidade de co-precipitação do escatol na saponificação. Os resultados observados no presente trabalho mostram que a

saponificação da amostra aumenta a repetitividade e extração da mesma, sendo uma etapa benéfica ao método que, portanto, foi incorporada ao método.

Seguindo a otimização do método, averiguou-se qual recobrimento de fibra melhor extraíria os analitos de interesse, gerando limites de quantificação coerentes com as quantidades mínimas dos analitos detectadas sensorialmente. Para analitos apolares, como os de interesse, as fibras de PDMS são mais recomendadas e esta foi a primeira escolha para testes, com espessura de recobrimento de 100 μm . Testaram-se também as fibras de PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS, por possuírem grande capacidade de adsorção devido ao grande número de sítios ativos. Como as diferenças em tamanho e ponto de ebulição dos analitos é grande, a vantagem no uso de recobrimento DVB é que reduz a discriminação de massa molar [74]. Na realização dos testes, extraiu-se amostras fortificadas, saponificadas com KOH e neutralizadas, sendo todos os ensaios, através do *headspace*, realizados em triplicata. A média das áreas medidas e o desvio padrão encontrados são mostrados na Figura 9 para os três tipos de recobrimento.

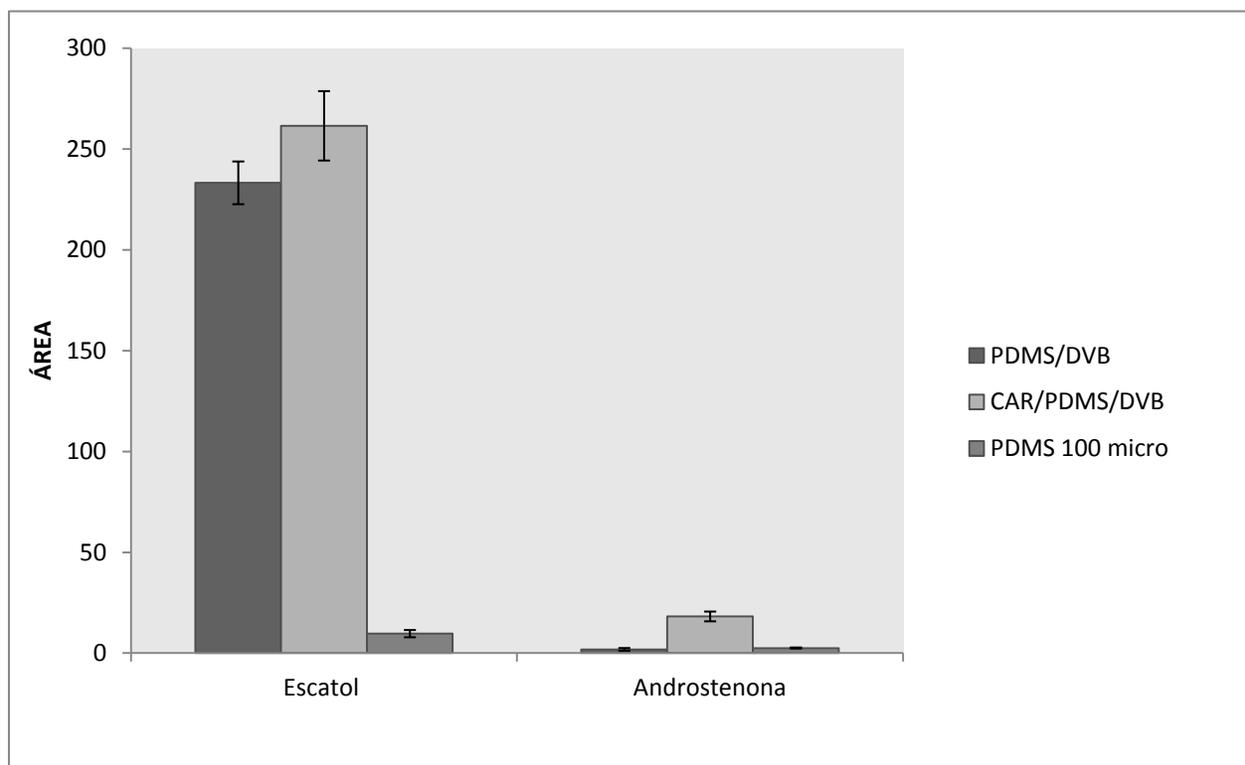


Figura 9: Área de pico obtida versus recobrimento de fibra para os dois analitos de interesse.

As fibras DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB mostraram maior área de pico para o escatol que a fibra PDMS 100 μm e para a androstenona a fibra DVB/CAR/PDMS se mostrou superior às outras duas (PDMS/DVB e PDMS 100 μm). A diferença entre as áreas obtidas para o escatol e a androstenona nas fibras de PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS, mostra a discriminação destas fibras, onde a extração é regida pela adsorção, entre compostos com maior volatilidade (escatol) e menor volatilidade (androstenona). Estas fibras extraem melhor compostos voláteis [66][74] pois eles estão mais disponíveis no início da extração, saturando os sítios ativos e impedindo que compostos menos voláteis e em menores quantidades desloquem os compostos já adsorvidos.

Uma justificativa para a pequena extração de androstenona seria devido à sua menor volatilidade e a grande quantidade de co-extrativos mais voláteis que ela. A temperatura utilizada no processo de extração foi de 80 $^{\circ}\text{C}$, uma temperatura que pode não ter sido suficiente para fazer com que a distribuição de analito entre a solução e o *headspace* fosse satisfatório para este analito [67]. Em um trabalho publicado em 2011 [62] os autores utilizaram SPME através do *headspace* e uma temperatura de 100 $^{\circ}\text{C}$, e obtiveram resultados satisfatórios. No laboratório, havia restrições experimentais que não permitiram testar temperaturas de extração maiores que as estudadas. Esta temperatura de 80 $^{\circ}\text{C}$ também aumentou a quantidade de co-extrativos na fase de vapor, que podem ter saturado os sítios ativos impedindo extração satisfatória da androstenona. Górecki *et al.*, em 1999 [77], ressaltaram que a presença de compostos adicionais numa extração com fibras sólidas reduz a quantidade de analito de interesse extraída pela fibra e, quando se tem grandes tempos de extração e muitos interferentes, os analitos com baixa afinidade pela fibra serão deslocados dos sítios ativos por compostos com maior afinidade, ou que estão presentes na amostra em grandes concentrações [67].

Como a diferença entre as áreas medidas entre DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB para o escatol não foram muito grandes optou-se por otimizar o método de extração para os dois tipos de fibra, já que a fibra DVB/CAR/PDMS possui menor resistência mecânica que a fibra PDMS/DVB. Essa menor resistência mecânica é devido às duas camadas de polímero adsorvidas que, devido ao aquecimento/resfriamento durante os processos da extração e

diferenças nos coeficientes de dilatação térmica, acabam descolando as camadas de polímero, impedindo o seu uso nos processos de extração.

5.3 Otimização Multivariada

Assim, procedeu-se ao planejamento Doehlert, uma planejamento de 2ª ordem que permite a obtenção de superfícies de resposta. Primeiramente lançou-se mão de um planejamento Doehlert com quatro variáveis para a fibra PDMS/DVB com as variáveis indicadas na seção 4.2.6. O planejamento Doehlert para quatro variáveis nos fornece diferentes níveis para cada uma, sendo que uma possui três níveis, outra possui cinco e outras duas possuem sete níveis. Pode-se verificar que o número de experimentos foi reduzido, comparado com outros planejamentos. Com os dados experimentais recolhidos, pode-se construir os modelos indicados nas Figura 10 e Figura 11 para os dois analitos.

Neste planejamento, a quantidade de androstenona extraída é muito pequena, devido à baixa partição desta entre solução-*headspace*, fazendo com que os erros absolutos sejam da grandeza das áreas medidas, e portanto o erro relativo (coeficiente de variação) é alto. Dessa forma, para fins de otimização, consideraram-se apenas os resultados obtidos para o escatol, com 95% de confiança. Para o escatol, o coeficiente de determinação do modelo (R^2) é de 0,92525, mostrando que 92,5% do modelo é explicado pela regressão e que o restante é devido aos resíduos [92]. Este modelo possui falta de ajuste, pois aplicando-se o teste F entre a média quadrática da falta de ajuste e a média quadrática do erro puro, o valor do teste F era superior ao $F_{\text{crítico}}$, mostrando a falta de ajuste do modelo, o que não permite previsões dentro do domínio estudado, sendo este usado apenas para fins de otimização.

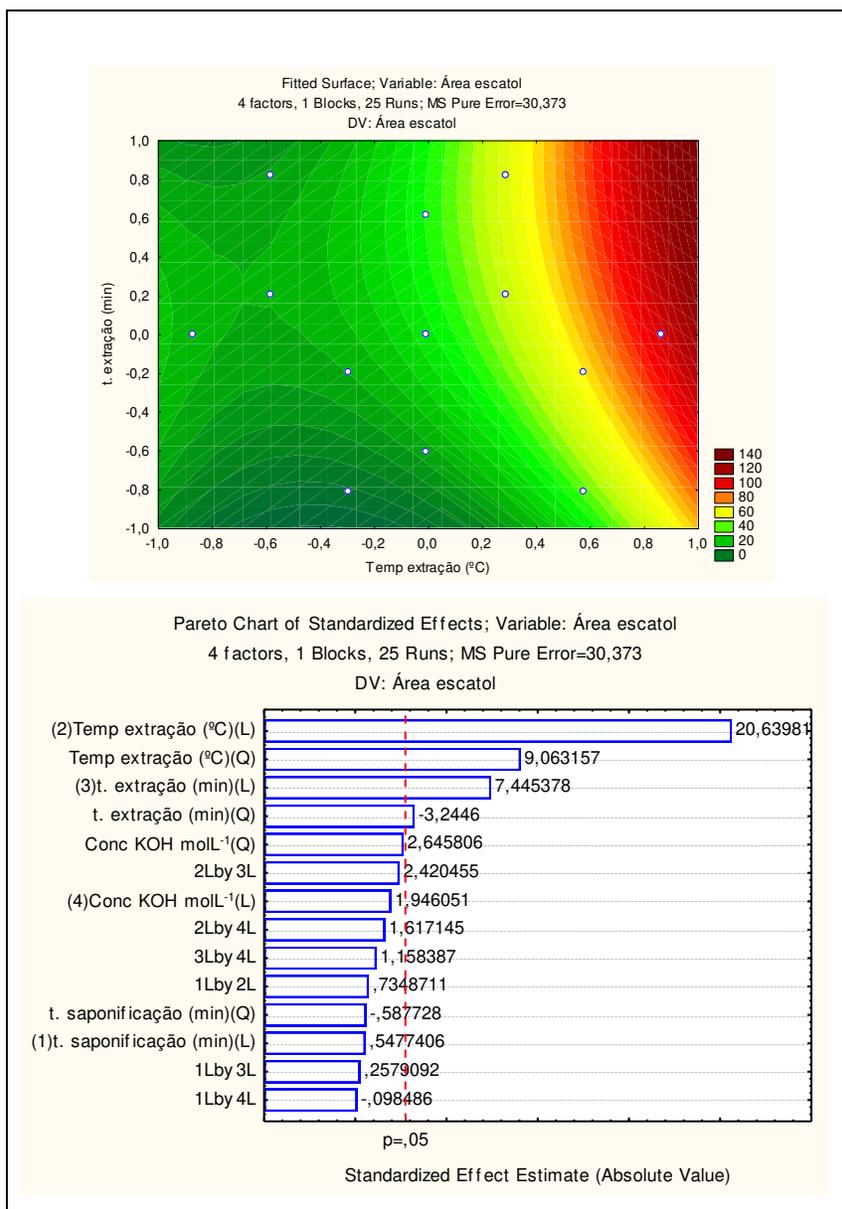


Figura 10: Diagrama de contorno e gráfico de Pareto para a fibra PDMS/DVB para o escatol. No gráfico de pareto, (L) se refere a termos lineares, (Q) a termos quadráticos e “X by Y” se refere a interação dos parâmetros X e Y.

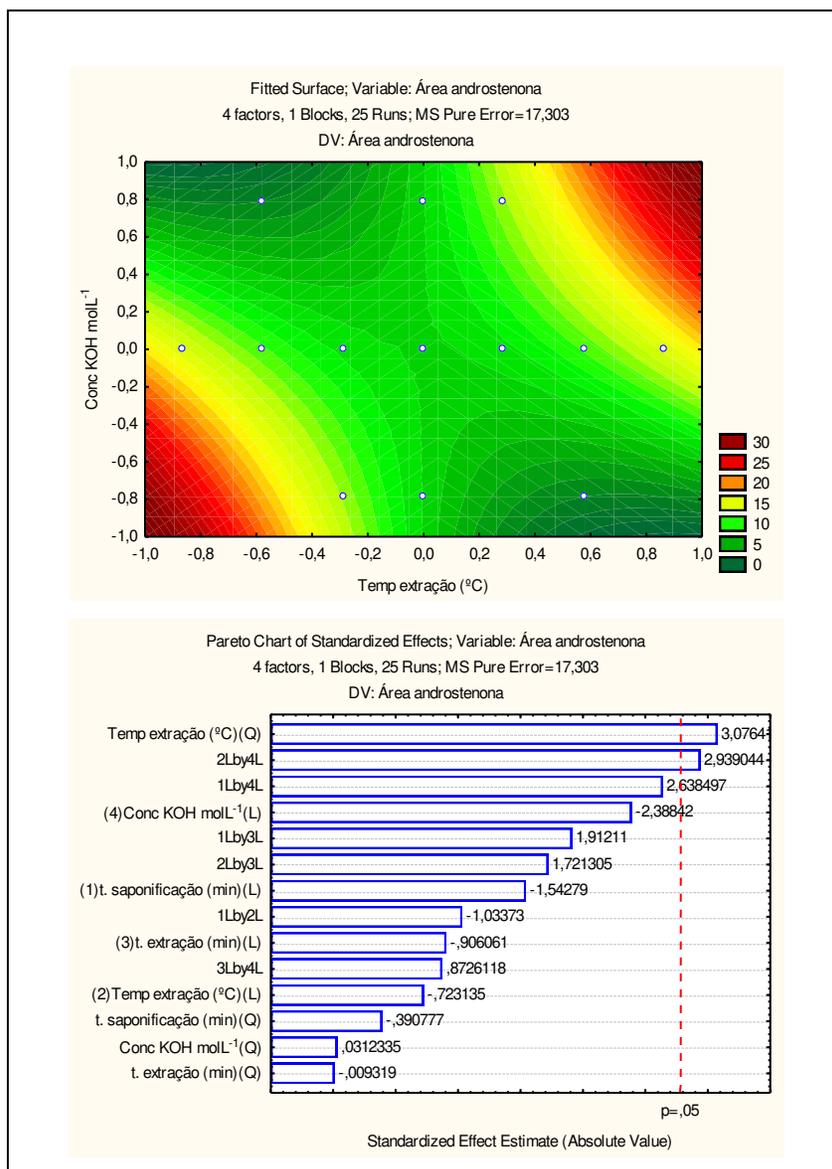


Figura 11: Diagrama de contorno e gráfico de Pareto para a fibra PDMS/DVB para androstenona. No gráfico de Pareto, (L) se refere a termos lineares, (Q) a termos quadráticos e “X by Y” se refere a interação dos parâmetros X e Y.

A análise de variância (ANOVA) para este modelo indicou que apenas os coeficientes de tempo de extração e temperatura de extração, linear e quadrático são significativos, o que pode-se observar no gráfico de Pareto para o escatol (Figura 10). A concentração de KOH e tempo de saponificação não são significativos para o modelo e dessa forma, pode-se escolher um dos níveis avaliados para estes parâmetros, pois eles não alteram

significativamente (95% de confiança) a extração. Optou-se por utilizar a concentração de KOH $5,00 \text{ mol L}^{-1}$ e tempo de saponificação de 15 minutos, devido ao fato de a concentração de KOH ter efeito positivo sobre a extração (embora não significativo), enquanto o tempo de 15 minutos de reação de saponificação torna a análise mais rápida, o que é interessante para amostras de rotina. Para as outras variáveis, as condições ótimas foram determinadas pela superfície de resposta e são, portanto, temperatura de extração de $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e tempo de extração de 30 minutos.

Após o desenvolvimento do planejamento com quatro variáveis para a fibra de PDMS/DVB, partiu-se para o desenvolvimento da otimização multivariada para a fibra com recobrimento DVB/CAR/PDMS. Para esta fibra, o planejamento foi desenvolvido apenas com duas variáveis, tempo e temperatura de extração. Os fatores tempo de saponificação e concentração independem do tipo de fibra, e portanto não foi necessária a otimização destes fatores novamente. No planejamento Doehlert para duas variáveis, uma delas é avaliada em 5 níveis e a outra variável é avaliada em 3 níveis [85]. Neste trabalho, o tempo de extração foi avaliado em 3 níveis e a temperatura de extração em 5 níveis. Após a obtenção das áreas dos analitos de cada ponto do planejamento, construiu-se o modelo, onde o gráfico de Pareto e o diagrama de contorno são mostrados nas Figura 12 e Figura 13, para o escatol e androstenona, respectivamente.

Assim como no planejamento para a fibra PDMS/DVB, a androstenona foi extraída em pequena quantidade e apresentando baixa repetitividade no ponto central, não sendo considerada na otimização. Para o escatol, o modelo obtido apresentou falta de ajuste, pois no teste F entre a média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro, o F encontrado foi maior que o $F_{\text{crítico}}$ (95% de confiança). Assim, este modelo também não pode ser usado para previsões [92], mas pode ser usado para o fim que se destinava. Pelo gráfico de Pareto, observamos que apenas o fator quadrático do tempo de extração é significativo, além dos termos lineares e quadráticos da temperatura de extração e que a interação entre os fatores é significativa, demonstrando que para esta fibra não poderia ser considerada uma otimização univariada [92]. No diagrama de contorno, verifica-se que as condições ótimas de extração para o escatol são temperatura de 80°C e tempo de 30 minutos.

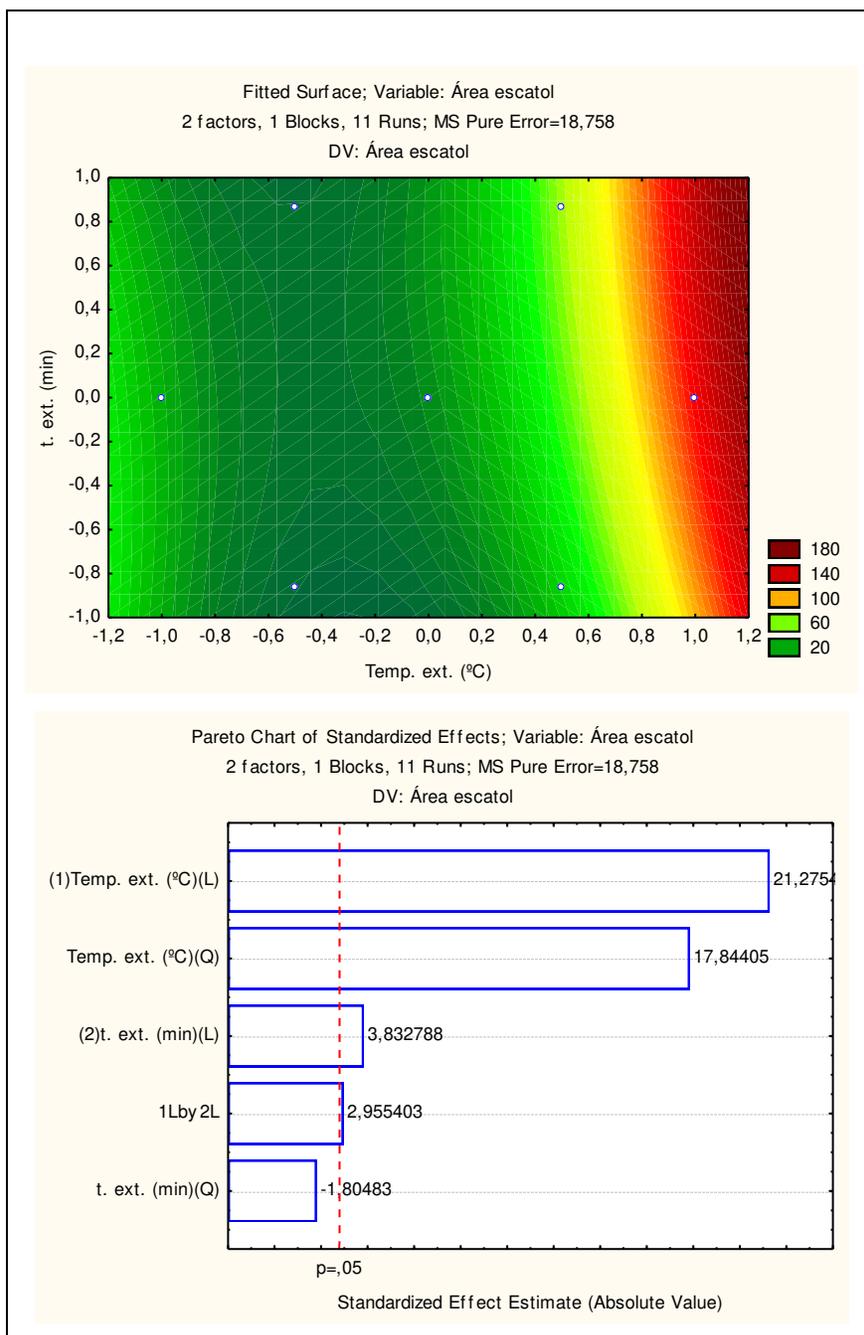


Figura 12: Diagrama de contorno e gráfico de Pareto para a fibra DVB/CAR/PDMS para o escatol. No gráfico de pareto, (L) se refere a termos lineares, (Q) a termos quadráticos e X by Y se refere a interação dos parâmetros X e Y.

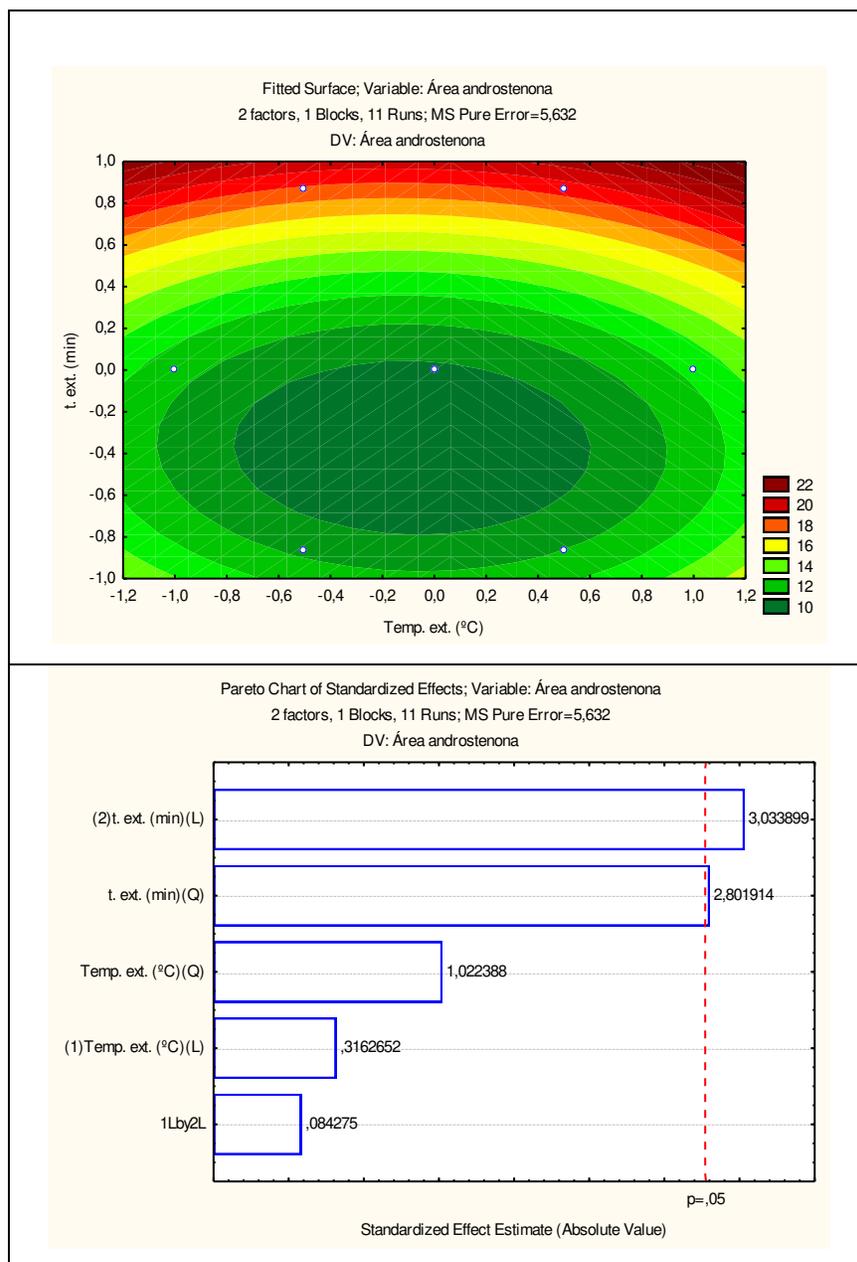


Figura 13: Diagrama de contorno e gráfico de Pareto para a fibra DVB/CAR/PDMS para androstenona. No gráfico de pareto, (L) se refere a termos lineares, (Q) a termos quadráticos e X by Y se refere a interação dos parâmetros X e Y.

Um cromatograma típico obtido com a fibra DVB/CAR/PDMS é mostrado na Figura 14, sendo as concentrações dos analitos iguais a $30 \mu\text{g g}^{-1}$. Nesse cromatograma, pode-se notar a grande quantidade de co-extrativos presentes na amostra, e a baixa intensidade dos picos

correspondentes ao escatol e a androstenona em comparação com compostos majoritários. Observa-se que, devido ao maior ponto de ebulição da androstenona, sua eluição é bem tardia em relação ao escatol, e que poucos compostos eluem após este composto. Isso indica que a androstenona está no limite da técnica de SPME através do *headspace*, o que justifica os resultados não satisfatórios obtidos.

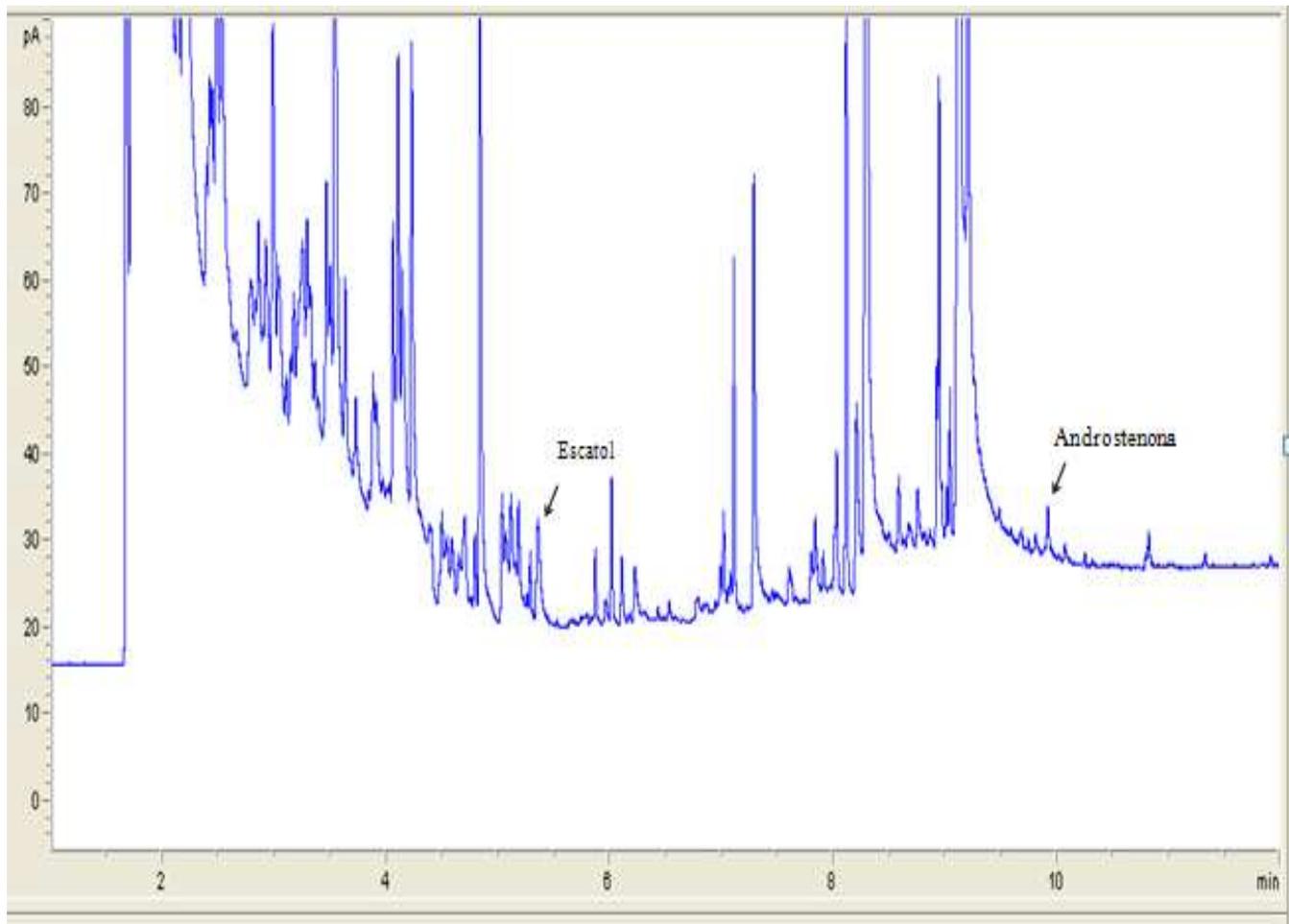


Figura 14: Cromatograma típico obtido durante o procedimento de extração com a fibra DVB/CAR/PDMS, sendo as concentrações de androstenona e escatol $30 \mu\text{g g}^{-1}$. Condições de extração: saponificação por 15 minutos com solução de KOH $5,00 \text{ mol L}^{-1}$, extração a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min com a fibra DVB/CAR/PDMS. Condições cromatográficas: Coluna HP-5, temperatura do injetor $250 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura do detector $250 \text{ }^\circ\text{C}$, condições do forno: $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min), $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $300 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min), He ($1,00 \text{ mL min}^{-1}$)

Concluída a otimização do método analítico para as duas fibras selecionadas, comparou-se as áreas obtidas para o escatol no ponto ótimo das duas fibras, sendo para a fibra PDMS/DVB igual a 112 e para a fibra DVB/CAR/PDMS, 138. Esses valores não apresentam grande diferença e entre vantagens e desvantagens entre as fibras, optou-se por realizar a validação para as duas fibras testadas e verificar se em alguma das etapas haveria vantagem de uma em relação a outra.

5.4 Condições cromatográficas em GC×GC

Com o intuito de aumentar a detectabilidade da androstenona e devido ao grande número de co-extrativos utilizou-se GC×GC na tentativa de melhoramento do método. A GC×GC tem grande capacidade de pico e pode separar melhor os co-extrativos do analito de interesse, além de aumentar a detectabilidade dos analitos, pelo aumento na relação sinal-ruído [80]. Assim, antes de dar início à validação do método, otimizaram-se as condições cromatográficas em GC×GC. Utilizou-se os protótipos de GC×GC-FID e GC×GC-qMS desenvolvidos no próprio laboratório [81][93]. Na figura 15 pode-se observar um cromatograma típico de uma amostra de toucinho extraída com fibra PDMS/DVB e analisada por GC×GC-FID.

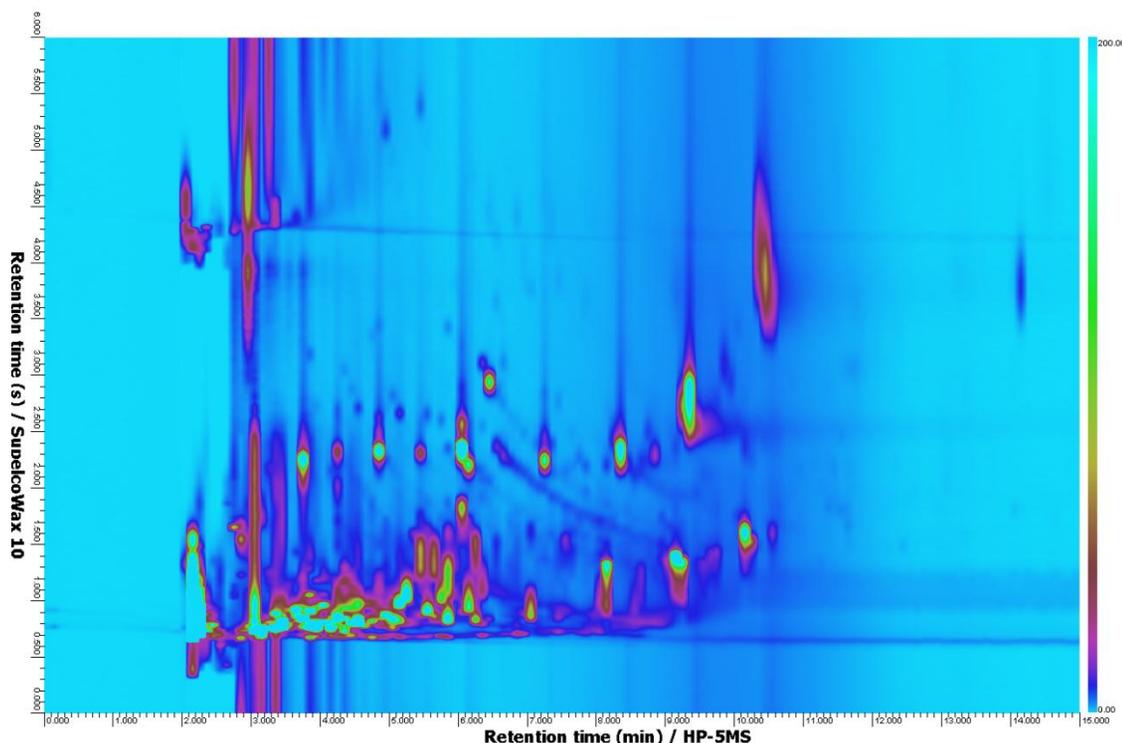


Figura 15: Cromatograma de GCxGC-FID de uma amostra de toucinho dopada e extraída pelo método otimizado com a fibra PDMS/DVB. Condições cromatográficas: jogo de colunas HP-5 (5% de fenil-polidimetilsiloxano), coluna de sílica fundida (30 m × 0,25 mm, 0,25 mm) + DB-Wax (Polietilenoglicol-PEG) coluna (1 m × 0.1 mm, 0.1 mm), temperatura do injetor 250 °C; temperatura da coluna: isoterma a 100°C por 1 min, aquecida a 20°C min⁻¹ até 240°C e isoterma a 240° por 12 minutos; H₂ como gás de arraste, vazão de 0,6 mL min⁻¹, período de modulação 6s.

O objetivo inicial era validar o método nos equipamentos de GC-FID, GCxGC-FID e GCxGC-qMS e comparar os limites de quantificação dos três. Mas ao iniciar a validação com os equipamentos de GC-FID e GCxGC-FID, percebeu-se que a área medida para a androstenona era muito pequena e optou-se por fazer a validação apenas no GCxGC-qMS. Neste equipamento, inicialmente trabalhou-se com o modo de varredura (SCAN), mas também não foi possível obter áreas satisfatórias para a a androstenona e o trabalho foi continuado com o equipamento operando no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), onde foi possível uma melhor visualização, principalmente da androstenona.

Garcia-Regueiro e Diaz em 1989 [17] analisaram androstenona e outros esteróides por GC-FID, sendo a recuperação do método utilizado por eles de 75% para este analito. Brabander e Verbekeem em 1986 [16] analisaram androstenona por GC-ECD juntamente com um derivatizante. Já Thomson e Pearson, em 1977 [15], utilizaram também GC-MS no

modo SIM, pois no modo SCAN havia co-eluição com componentes da matriz e baixa relação sinal-ruído. Assim, utilizar o modo SIM é uma alternativa para aumentar a detectabilidade do método para os analitos e reduzir interferências da matriz. Para determinação dos íons que seriam monitorados para cada analito, padrões destes foram injetados e os fragmentos que apresentaram maior intensidade no espectro de massas e que estavam presentes em menor intensidade nos espectros de massa dos co-extrativos, foram escolhidos para determinação destes compostos.

5.5 Validação do método

Para que o método desenvolvido gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, uma validação deve ser desenvolvida[94]. Um processo de validação bem definido e documentado oferece evidências objetivas de que os métodos são adequados para o uso desejado. Assim, uma validação do método desenvolvido para as duas fibras foi aplicada para que houvesse uma maior confiabilidade nos resultados obtidos com estes. Seguindo as orientações de Ribani *et al.* [94] e as normas da FDA [89], avaliaram-se linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Optou-se por realizar a validação das duas fibras ao mesmo tempo, para verificar vantagens e desvantagens de uma em relação a outra. Iniciou-se o processo de validação construindo-se curvas de calibração com as duas fibras nas condições ótimas. As concentrações variaram entre 0,05 e 0,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o escatol e 0,50 e 10,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para a androstenona. Para a fibra PDMS/DVB não obteve-se uma curva analítica para nenhum dos dois analitos, como pode ser observado na Figura 17. Isso pode ser atribuído a quantidades limitadas de sítios ativos, que não discriminou as diferentes concentrações.

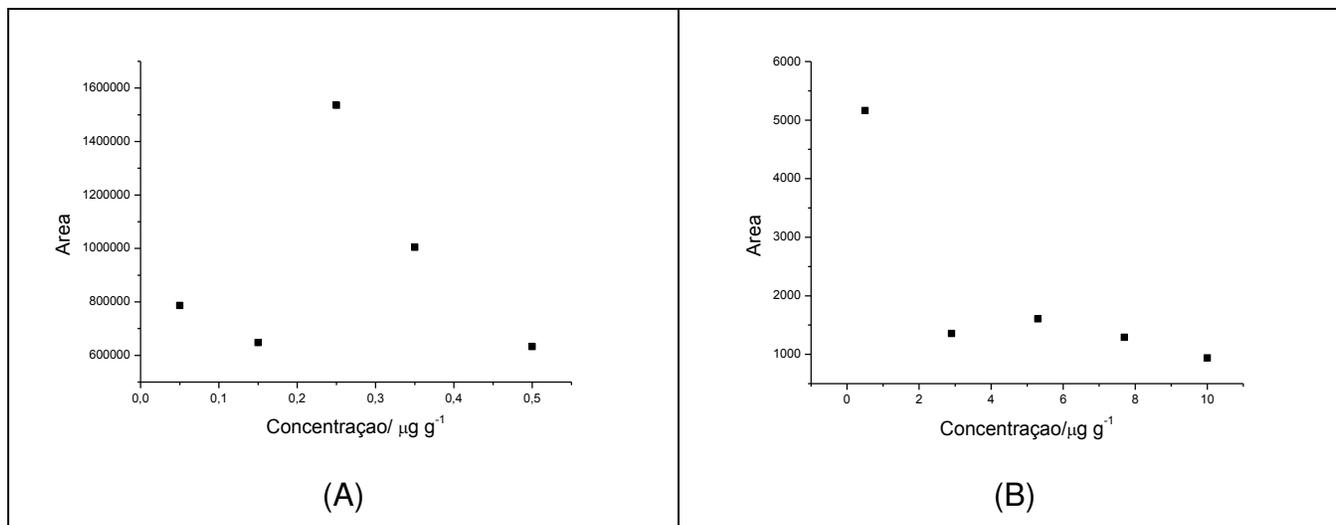


Figura 16: Concentração de escatol (A) e androstenona (B) versus área dos picos obtidas para a fibra PDMS/DVB.

Dessa forma, nesta etapa eliminou-se a fibra PDMS/DVB e a validação do método foi continuada apenas com a fibra DVB/CAR/PDMS. Para esta fibra, os valores de do coeficiente de correlação (R) obtidos foram de 0,9299 e de 0,9596, pra escatol e androstenona, respectivamente. A FDA recomenda que os pontos das extremidades sejam retirados até obter-se uma curva cujo valor de R seja igual ou maior que 0,99. Tendo isto em vista, retirou-se o ponto com concentração de $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$ para o escatol e de concentração $10,00 \mu\text{g g}^{-1}$ para androstenona. Os R determinados novamente foram 0,9906 para o escatol e 0,9553 para androstenona, um valor satisfatório para o primeiro, mas não para o segundo. As curvas e equações correspondentes são mostradas nas figuras 16 (escatol) e 17 (androstenona).

Assim, a linearidade do método para o escatol foi de $0,05$ a $0,35 \mu\text{g g}^{-1}$ e para a androstenona como um alto valor de R não foi obtido, não se pode determinar a linearidade em conformidade com as condições previstas pela FDA. Este pequena faixa linear foi obtida pois a fibra DVB/CAR/PDMS possui um limite de sítios ativos disponíveis, além de haver grande quantidade de co-extrativos presentes na amostra, que saturam estes sítios. Com a equação obtida pela curva de calibração, determinaram-se o limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o escatol e androstenona pelas Equações 8 e 9.

$$LD = 3,3 \times \frac{\text{Erro do coeficiente A}}{\text{Valor do coeficiente B}} \quad (8)$$

$$LQ = 10 \times \frac{\text{Erro do coeficiente A}}{\text{Valor do coeficiente B}} \quad (9)$$

O limite de detecção do escatol foi $0,020 \mu\text{g g}^{-1}$ e o limite de quantificação foi $0,072 \mu\text{g g}^{-1}$. Para a androstenona estes foram iguais a $0,743 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,25 \mu\text{g g}^{-1}$. A quantidade mínima perceptível para o escatol é de $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$ e como o limite de quantificação encontrado é menor que este valor, a viabilidade do método por SPME para este analito pode ser confirmada. Os limites de quantificação obtidos por outros autores [18][25][28] variam entre $0,004$ e $0,050 \mu\text{g g}^{-1}$. Para a androstenona, as quantidades mínimas detectáveis são de $1,00 \mu\text{g g}^{-1}$, e portanto apenas o limite de detecção ficou abaixo deste valor. Assim, para o escatol é possível quantificar amostras em quantidades menores que as detectadas sensorialmente, enquanto que para a androstenona, este limite não é seguro, mas é uma boa estimativa, onde pode-se dizer se a androstenona está presente nas amostras de toucinho que serão estudadas.

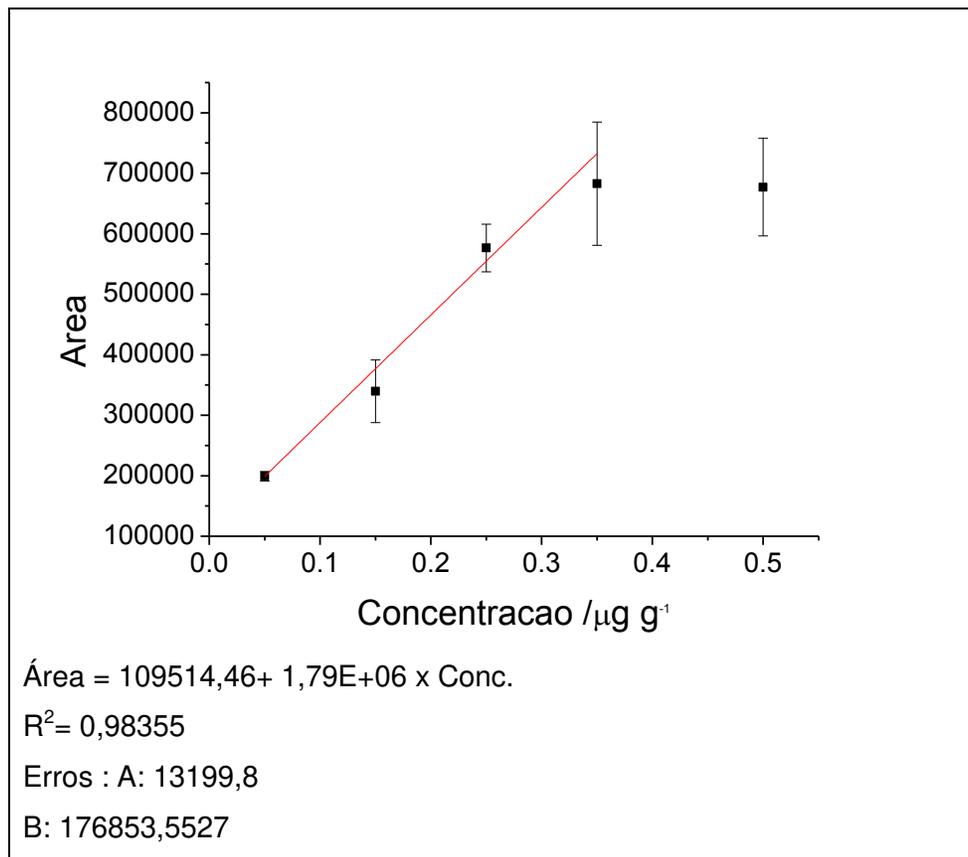


Figura 17: Curva Analítica para o escatol.

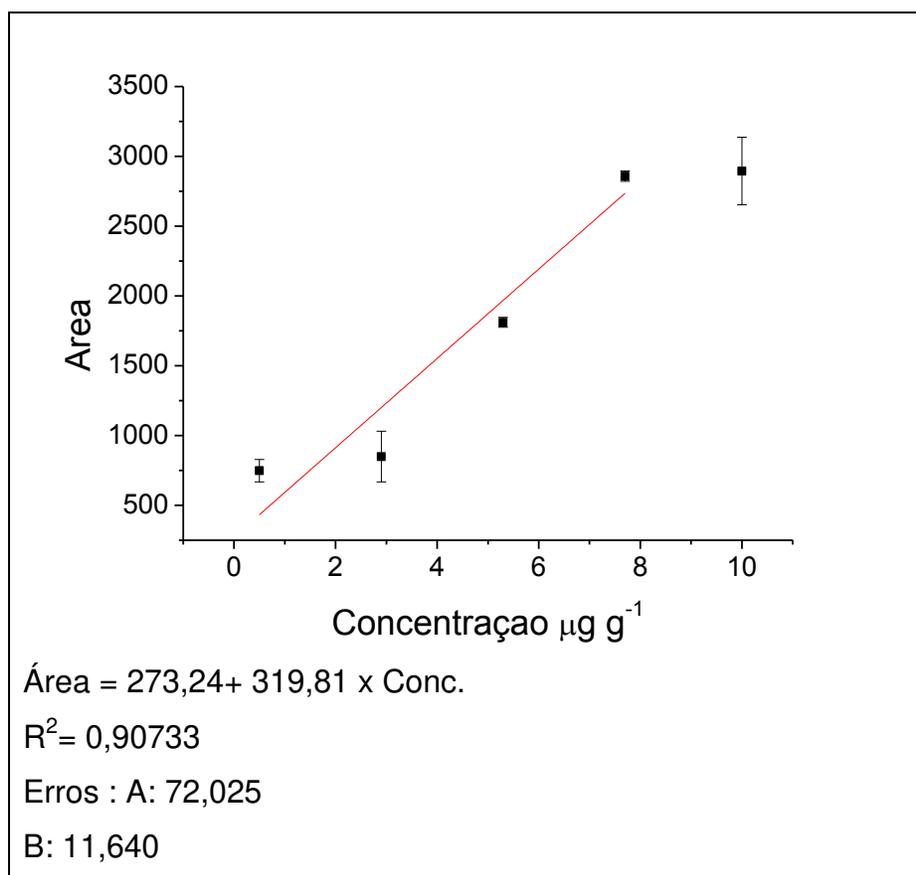


Figura 18: Curva Analítica para androstenona.

Tendo determinado os limites de detecção e quantificação, partiu-se para a etapa de avaliação da precisão do método. Para isso foram estudados a repetitividade e a precisão intermediária. Para avaliação da repetitividade, foram realizadas sete extrações com amostras fortificadas com concentrações de escatol no toucinho de $0,20 \mu\text{g g}^{-1}$ e androstenona $5,00 \mu\text{g g}^{-1}$, medindo-se as áreas e avaliando-se o coeficiente de variação (CV). Para a androstenona, os valores do CV ficaram muito maiores que os valores aceitos e mesmo em diferentes tentativas não foi possível obter um CV satisfatório. Assim, a validação para a androstenona não prosseguiu e os testes foram realizados apenas para o escatol. Os dados obtidos para o escatol são mostrados na tabela 5. Pawliszyn [76] relata que para se obter boa repetitividade em SPME o coeficiente de variação deve ser menor que 15% e Ribani *et al.* [94] diz que este valor deve ser menor que 20 % para amostras complexas.

Tabela 5: Média, desvio padrão e coeficiente de variação da área dos picos obtidos durante a avaliação da repetitividade para o escatol.

Média	Desvio padrão	CV(%)
$7,10 \times 10^5$	$6,90 \times 10^4$	9,73

Na avaliação da precisão do método, a precisão intermediária também foi desenvolvida. Para esta, foram realizadas sete extrações de amostras dopadas em mesmas concentrações de escatol em dois dias diferentes e por um teste t com 95 % de confiança foi analisado se as amostras faziam parte da mesma população. As médias e desvio padrão para os dois dias avaliados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Média, desvio padrão e coeficiente de variação da área dos picos obtidos durante a avaliação da precisão intermediária para o escatol.

	Média	Desvio Padrão	CV(%)
1º dia	$7,10 \times 10^5$	$6,90 \times 10^4$	9,73
2º dia	$6,90 \times 10^5$	$5,97 \times 10^4$	8,63

No teste t realizado com 95% de confiança as amostras são estatisticamente equivalentes, logo não há variação significativa se os ensaios forem realizados em dias diferentes, mostrando a precisão intermediária do método. Assim, pela avaliação da repetitividade e da precisão intermediária pode-se verificar que a precisão do método para o escatol.

Concluída esta etapa, partiu-se para a determinação da exatidão do método. As normas da FDA [89] e as indicações de Ribani *et al.* [94], deveria-se fazer ensaios de recuperação em triplicata em três diferentes concentrações e avaliar se a recuperação está entre 70 e 120%, já que não existem padrões certificados para esta amostra. Para determinar a exatidão, extraíram-se amostras fortificadas, em três diferentes concentrações ($0,144$, $0,200$ e $0,300 \mu\text{g g}^{-1}$) e pela curva de calibração calculou-se as concentrações apresentadas pelo método de cada uma delas. Assim, determinou-se a porcentagem de erro em relação à quantidade adicionada e pode-se avaliar a exatidão do método. Os valores de

concentração fortificados, a estimativa da concentração pela curva de calibração, a porcentagem de erro e o coeficiente de variação são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Concentração real (fortificada), estimativa da concentração pela curva de calibração, erro relativo e coeficiente de variação obtidos durante a avaliação da exatidão para o escatol.(n=3)

Concentração Real ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Estimativa da Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Erro relativo(%)	CV
0,144	0,112	22,2	16,81
0,200	0,194	3,00	2,76
0,300	0,443	47,7	17,76

Pode ser observado pela Tabela 7 que os erros relativos encontrados para amostras com maior concentração são bem maiores que aqueles encontrados para menores concentrações, o que indica que se as concentrações encontradas são altas, deve-se proceder à uma diluição para obter maior confiabilidade nos resultados. Segundo Pawliszyn [95], foi observado que em diversas amostras com grandes quantidades de gordura, a repetitividade nos resultados é menor comparando-se com outros tipos de amostra.

Assim, o método apresenta exatidão, desde que as concentrações de escatol estejam na faixa de $0,200 \mu\text{g g}^{-1}$. A Figura 20 mostra um cromatograma típico obtido durante a validação utilizando GCxGC-qMS. Neste cromatograma pode-se observar que devido a menor temperatura de ebulição do escatol em relação à androstenona, sua eluição na ^1D é bem anterior à eluição da androstenona.

A ^2D , neste caso, é um coluna polar, mas que devido à uma programação linear de temperatura elevada, não permite que os mecanismos de separação na ^1D e ^2D sejam totalmente distintos, e isso faz com que a androstenona, na segunda dimensão, também tenha uma eluição em um tempo maior que o escatol.

Embora esteja sendo usado o monitoramento de íons seletivos, pode-se observar para o escatol a grande quantidade de compostos que co-eluem com este na ^1D . Isso mostra que a utilização de GC convencional necessitaria de mais passos de purificação para aumentar a seletividade da extração para este analitos. A utilização de SPME e GC convencional

utilizando apenas a saponificação não seria seletiva, devido à grande quantidade de co-extrativos.

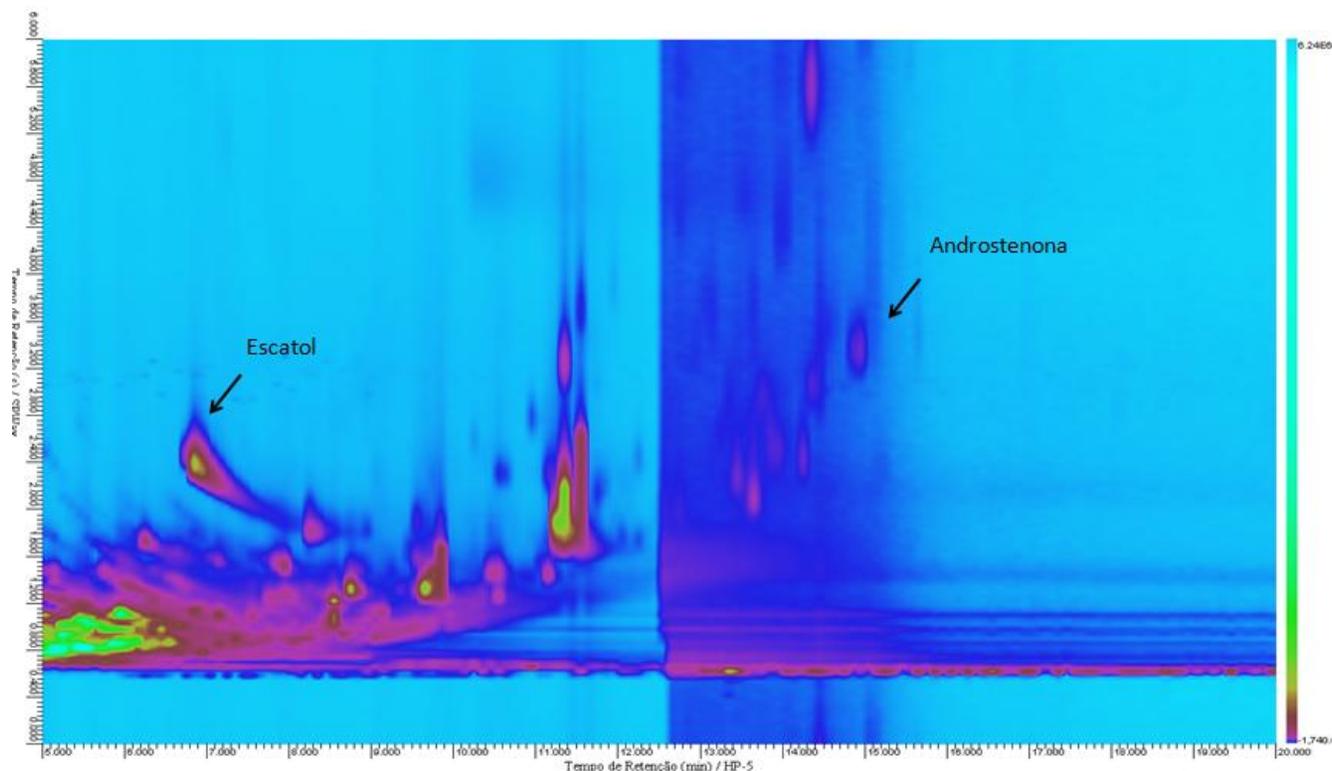


Figura 19: Cromatograma típico (GCxGC-qMS) de amostra com $0,250 \mu\text{g g}^{-1}$ escatol e $7,70 \mu\text{g g}^{-1}$ androstenona. jogo de colunas HP-5 (5% de fenil-polidimetilsiloxano), coluna de sílica fundida ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$, $0,25 \text{ mm}$) + SPWax (Polietilenoglicol-PEG) coluna ($1 \text{ m} \times 0,1 \text{ mm}$, $0,1 \text{ mm}$), temperatura do injetor $250 \text{ }^\circ\text{C}$; temperatura da coluna: isoterma a 100°C por 1 min, aquecida a $20^\circ\text{C min}^{-1}$ até 240°C e isoterma a 240° por 12 minutos; H_2 como gás de arraste, vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, período de modulação 6s.

5.6 Aplicação do Método em amostras

Sabendo de todas estas características e estando o método validado, partiu-se para a análise de amostras cedidas pelo ITAL. As sete amostras cedidas correspondem a porcos machos imunocastrados e inteiros. Para análise destas amostras, elas passaram por todo o processo desde à retirada da pele e congelamento com N_2 líquido, até a extração. Pelas áreas obtidas, calcularam-se as concentrações de escatol e avaliou-se a presença de

androstenoa. Amostras com concentrações maiores que $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$ de escatol foram diluídas de acordo com a necessidade, para concentrações menores que $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$. A Tabela 8 mostra as concentrações de escatol obtidas para as amostras testadas e a avaliação da presença ou não da androstenoa nestas amostras.

Tabela 8: Amostras obtidas do ITAL que foram analisadas pelo método proposto.

Nome da Amostra	Escatol	Androstenoa
	Média da concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Detecção/ $\mu\text{g g}^{-1}$
1	0,387	Detectado, > 0,743
2	0,994	Detectado, > 0,743
3	Detectado, < 0,072	Não detectado, < 0,743
4	Detectado, < 0,072	Não detectado, < 0,743
5	Detectado, < 0,072	Não detectado, < 0,743
6	Detectado, < 0,072	Não detectado, < 0,743
7	Detectado, < 0,072	Não detectado, < 0,743

As amostras 1, 2 e 3 correspondem a porcos inteiros, ou seja, porcos não castrados. Dois deles apresentaram grandes concentrações de escatol e em um deles a concentração de escatol foi menor que o limite de quantificação. Isto está em conformidade com o que é observado, pois cerca de 10% de porcos machos inteiros desenvolvem *boar taint* [37][38]. Já as amostras 4, 5, 6 e 7 correspondem a porcos imunocastrados, mostrando a eficiência nesta forma de castração, já mostrada por outros autores.

Capítulo 6:

Conclusões

6 Conclusões

O método desenvolvido se mostrou adequado para a detecção e quantificação de escatol em níveis compatíveis com as concentrações detectáveis sensorialmente. Já para a androstenona não foi possível a obtenção de um método satisfatório para quantificação, sendo possível apenas avaliar a presença deste analito. Além disso, pode-se observar a grande vantagem da GC×GC em relação a GC convencional, devido a eluição do escatol com componentes da matriz na primeira dimensão, além do grande aumento na detectabilidade deste.

Este trabalho demonstra que GC×GC pode ser uma alternativa interessante em determinações de analitos individuais (*target analysis*), o que vem em contraste com vários trabalhos que indicam que a GC×GC é interessante apenas para perfis cromatográficos de amostras complexas. A grande vantagem da GC×GC é o incremento em detectabilidade e poder de separação, que viabiliza o uso de técnicas mais simples e rápidas, porém menos seletivas, na etapa de preparo de amostra.

O método desenvolvido apresenta considerável redução de tempo de análise e manipulação de amostra em comparação às alternativas empregadas, além de apresentar maior seletividade.

Capítulo 7:

Referências Bibliográficas

7 Referências Bibliográficas

- [1]Abipecs: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_r elatorio_2010_pt.pdf, acessado em 01/11/2011.
- [2]Bredahl, L., Grunert, K.G., Fertin, C., *Food Qual. Prefer.*, vol. 9, pp. 273-281, 1998.
- [3]Grunert, K.G., Larsen, H., Madsen, T. K., Baadsgaard, A., *Market Origin in Food and Agriculture*, Kluwer Academic Press, 1996, Boston.
- [4]Bryhni, E. A., Byrne, D. V., Rødbotten, M., Claudi-Magnussen, C., Agerhem, H., Johansson, M., *Food Qual. Prefer.*, vol. 13, pp. 257-266, 2002.
- [5]Magard, M. A., Berg, H. E. B., Tagesson, V., Jaremo, M. L. G., Karlsson, L. L. H., Mathiasson, L. J. E., Bonneau, M., Hansen-Moller, J., *J. Agric. Food. Chem.*, vol 43, pp.114-120, 1995.
- [6]Patterson, R. L. S., *J. Sci. Food Agric.*, Vol 19, pp. 31-38, 1968.
- [7]Vold, E., *Report No. 238. Vollabekk*, Norway: Institute of Animal Genetics and Breeding, N.L.H, 1970.
- [8]Babol, J., Squires, E. J., Gullett, E. A., *Food Res. Int.*, vol 28, pp 573-581, 1996.
- [9]Squires, E. J., Young, L. G., Hacker, R. R., Adeola, O., *Can. J. Anim. Sci.*, vol. 73, issue 1, pp. 1-23, 1993.
- [10]Annor-Frempong, I. E., Nute, G. R., Whittington, F. W., Wood, J. D., *Meat Sci.*, vol 47 ,nº ½, pp. 63-76, 1997.
- [11]Lunde, K., Skuterud, E., HErsleth, M., Egelandsdal, B., *Meat Sci.*, vol 85, pp. 706-711, 2010.
- [12]Font i Furnols, M., Gispert, M., Guerrero, L., Velarde, A., Tibau, J., Soler, J., Hortós, M., Garcia-Regueiro, J.A., Pérez, J., Suárez, P., Oliver, M. A.; *Meat Sci.* , vol 80, p. 1013–1018, 2008.
- [13]Bonneau, M., Enright, W. J., *Livest. Prod. Sci.*, vol 42, pp. 193-200, 1995.
- [14]Haugen, J. E., Brunius, C., Zamaratskaia, *Meat Sci.*, vol. 90, pp. 9-19, 2012.
- [15]Thompson Jr., R. H., Pearson, A. M., *J. Agric. Food Chem.*, vol 25, nº 6, pp. 1241-1245, 1977.
- [16]Brabander, H. F, Verbeke, R., *J. Chromatogr.*, vol. 363, pp. 293-302, 1986.
- [17]Garcia-Regueiro, J. A., Diaz, I., *Meat Sci.*, vol. 25, pp. 307-316, 1989.
- [18]Verheyden, K., Noppe, H., Aluwé, M., Millet, S., Bussche, J. V., Brabander, H, F., *J. Chromatogr. A*, vol. 1174, pp. 132-137, 2007.
- [19]Squires, E. J., *Can. J. Anim. Sci.*, vol. 70, pp. 1029-1040, 1990.
- [20]Andressen, Ø., *Acta Endocrinol.*, vol 79, pp. 619-624, 1975.
- [21]Andressen, Ø., *Acta Vet. Scand.*, vol 20, pp.343-350, 1979.
- [22]Tuomola, M., Harpio, R., Wirta, E. R., & Lövgren, T., *Meat Sci.*, vol. 61, pp. 193–197, 2002.
- [23]Tuomola, M., Harpio, R., Knuutila, P., Mikola, H., & Lövgren, T., *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, pp. 3529–3534, 1997.
- [24]Peleran, J. C., Bories, G. F., *J. Chromatogr.*, vol. 324, pp. 469-474, 1985.
- [25]Dehnhard, M., Claus, R., Hillenbrand, M., Herzog, A., *J. Chromatogr.*, vol. 616, pp. 205-209, 1993.
- [26]Garcia-Regueiro, J. A., Diaz, I., *J. Chromatogr. A*, vol 809, pp. 246-251, 1998.

- [27]Hansen-Møller, J., *J. Chromatogr.*, vol 624, pp. 479-490, 1992.
- [28]Hansen-Møller, J., *J. Chromatogr.*, vol. 661, pp. 219–230, 1994.
- [29]Valente, A. L. P, Augusto, F., *Quím. Nova*, vol. 23, pp.523-530, 2000.
- [30]Arthur, C. L., Pawliszyn, J. *Anal. Chem.*, vol. 62, pp. 2145-2148, 1990.
- [31]Lui, Z.; Phillips, J. B.; *J. Chromatogr. Sci.* ,vol. 29, 227, 1991.
- [32]Pedroso, M. P., Godoy, L. A. F., Fidélis, C. H. V., Ferreira, E. C, Poppi, R. J., Augusto, F., *Quím. Nova*, Vol. 32, nº 2, pp. 421-430, 2009.
- [33]Dallüge, Beens, J., Brinkman, U. A. T., *J. Chromatogr. A*, vol. 100, pp. 69-108, 2003.
- [34]Herrero, M. , Ibáñez, E., Cifuentes, A., Bernal, J., *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, pp. 7110-7129, 2009.
- [35]http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-externo/destinos/dados-anuais/NOVEMBRO_11_PRINCIPAIS_DESTINOS.pdf, acessado em 12/06/2012.
- [36]Especial Suinocultura: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/documentos-tecnicos/Especial_Suinocultura_-_Agroanalysis.pdf, acessado em 12/06/2012.
- [37]Maimfors, B., Lundstrom, K., *Livest. Prod. Sci.*, vol.10, pp.187-196,1983.
- [38]Diestre, A., Oliver, M. A., Gispert, M., Arpa, L., Arnau, J. *Anim. Prod.*, vol.50, pp.519-530,1980.
- [39]Robic, A., Larzul, C., Bonneau, M., *Genet. Sel. Evol.*, vol. 40, pp.129-143, 2008.
- [40]Zamaratskaia, G., Andersson, H. K., Chen, G., Andersson, K., Madej, A., Lundstrom, K., *Reprod. Domest. Anim.*, vol. 43, pp. 351-359, 2008.
- [41]Babol, J., Squires, E. J., Lundstrom, K., *J. Anim. Sci.*, vol 77, pp. 84-92, 1999.
- [42]Bonneau, M., Kempster, A. J., Claus, R., Claudi-Magnussen, C., Diestre, A., Tornberg, E., Walstra, P., Chevillon, P., Weiler, U., Cook, G. L., *Meat Sci.*, vol. 54, pp. 251-259, 2000.
- [43]Whittington, F. M., Zammerini, D., Nute, G.R., Baker, A., Hughes, S. I., Wood, J. D., *Meat Sci.*, vol. 88, pp. 249-255, 2011.
- [44]Annor-Frempong, I. E., Nute, G.R., Whittington, F. W., Wood, J. D., *Meat Sci.*, vol. 47, pp.49-61, 1997.
- [45]Annor-Frempong, I. E., Nute, G. R., Whittington, F. W., Wood, J. D., *Meat Sci.*, vol. 47, pp. 63-76, 1997.
- [46]Dehnhard, M., Bernal-Barragan, H., Claus, R., *J. Chromatogr.*, vol. 556, pp. 101-107, 1991.
- [47]Kock, H. L., Heinze, P. H., Potgieter, C. M., Dijksterhuis, G. B., Minnaar, A., *Meat Sci.*, vol. 57, pp. 61-70, 2001.
- [48]Bejerholm, C., Barton-Gade, P., Bonneau, M., Measurement and Prevention of Boar Taint in Entire Male Pigs, INRA, Paris, pp. 75-79, 1993.
- [49]Singh, P., Shina, A., Afzal, R., Brock, T. K., *Proceedings. 34^a International Congress Meat Science Technology Brisbane*, pp.692-694, 1988.
- [50]Claus, R., Weiler, U., Herzog, A., *Meat Sci.*, vol. 38, pp 289-305, 1994.
- [51]Zamaratskaia, G., Babol, J., Andersson, H., Lundstrom, K., *Livest. Prod. Sci.*, vol. 87, pp. 91-98, 2004.
- [52]Lundstrom, K., Malmfors, B., Hansson, I., Edqvist, L. E., Gahne, B., *J. Agric. Res.*, vol. 8, pp 171-178, 1978.
- [53]Tuomola, M., Harpio, R., Wirta, E., Lovgren, T., *Meat Sci.*, vol. 61, pp. 193-197, 2002.

- [54]Nute, G. R., Whittington, F. W., Warris, P. D., Wood, J. D., *Proceedings Meeting Of the EAAP Work. Group. Production and Utilisation of Meat from Entire Male Pigs*, Meat and Livestock Comission, 1995.
- [55]Solé, M. A. R., Regueiro, J. A.G., *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, pp. 5303-5309, 2001.
- [56]Bonneau, M., Dufour, R., Chouvet, C., Roulet, C., Meadus, W., Squires, E. J., *J. Anim. Sci.*, vol 72, pp.14-20, 1994.
- [57]Dunshea, F. R., Colantoni, C., Howard, K., McCauley, I., Jackson, P., Long, L. A., Lopaticki, S., Nugent, E. A., Simons, J. A., Walker, J., Hennessy, D. P., *J. Anim. Sci*, vol. 79, pp. 2524-2535, 2001.
- [58]Gispert, M., Oliver, M. A., Velarde, A., Suarez, P., Pérez, J., Font i Furnols, M., *Meat Sci.* , vol. 85, pp. 664-670, 2010.
- [59] Zeng, X. Y., Turkstra, J. A., Jongbloed, A.W., van Diepen, J, Th. M., Meloen, R. H., Oonk, H. B., Guo, D. Z., van de Wiel, D. F. M., *Livest. Prod. Sci.*, vol. 77, pp. 1-11, 2002.
- [60] Baumgartner, J., Laister, S., Koller, M., Pfütner, A., Grodzycki, M., Andrews, S., Schmoll, F., *Appl. Anim. Behav. Sci.*, vol. 124, pp. 28-34, 2010.
- [61]Garcia-Regueiro, J. A., Hortós, M., Arnau, C., Monfort, J.M., *J. High. Res. Chromatog.*, vol. 9, pp.362-363, 1986.
- [62]Fischer, J., Elsinghorst, P. W., Bücking, M., Tholen, E., Petersen, B., Wüst, M., *Anal. Chem.*, vol. 83, pp. 6785-6791, 2011.
- [63]Porter, M.G., Hawe, S. M., Walker, N., *J. Sci. Food Agric.*, vol. 49, pp.203-209, 1989.
- [64]Squires, E.J., *Can. J. Anim. Sci.*, vol. 70, pp. 1029-1040, 1990.
- [65]Booth, W.D., Williamson, E.D., Patterson, *Anim. Prod.*, vol.42, pp.145-152, 1986.
- [66]Squires, E.J., Deng, H., Wu, L., Measurement and Prevention of Boar Taint in Entire Male Pigs, Paris: INRA Editions, pp.41-48, 1993.
- [67]Pawliszyn, J., *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 2543-2558, 2003.
- [68]Koning, S., Janssen, H., Brinkman, U. A.T., *Chromatographia*, vol. 69, pp S33-S78, 2009.
- [69]Yazdi, A. S., Sepehr, S., Es'haghi, Z., Moghadam, H.P., *Chromatographia*, vol. 72, pp.923-931, 2010.
- [70]Zhang, Z., Duan, H., Zhang, L., Chen, X., Liu, W., Chen, G., *Talanta*, vol. 78, pp.1083-1089, 2009.
- [71]Abilleira, E., Renobales, M., Nájera, A.I., Virto, M., Gordo, J.C.R., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Barron, L.J.R., *Food Chem.*, vol.120, pp.1162-1169, 2010.
- [72]Ligor, M., Jarmalaviciene, R., Szumski, M., Maruska, A., Buszewski, B., *J. Sep. Sci.*, vol. 31, pp.2707-2713, 2008.
- [73]Urbanowicz, M., Zabiegala, B., Namiesnik, J., *Anal. Bioanal.Chem.*, vol. 399, pp. 277-300, 2011.
- [74]Alpendurada, M. F., *J.Chromatogr. A*, vol. 889, pp. 3-14, 2000.
- [75]Zhang, Z., Pawliszyn, J., *Anal. Chem.*, vol. 65, pp.1843-1852, 1993.
- [76]Pawliszyn, J., *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. New York, N.Y.: Wiley-VCH, c1997. 247 p., il. ISBN 0471190349 (enc.).
- [77]Górecki, T., Yu, X., Pawliszyn, J., *Analyst*, vol. 124, pp. 643-649, 1999.
- [78]Stoll, D. R., Li, X., Wang, X., Carr, P. W., Porter, S.E.G., Rutan, S.C., *J. Chromatogr. A*, vol. 1168, pp. 3-43, 2007.
- [79] Phillips, J. B., Beens, J., *J. Chromatogr. A*, vol. 856, pp. 331-347, 1999.

- [80]Dallüge, J., Beens, J., Brinkman, U. A. T., *J. Chromatogr. A*, vol. 1000, pp. 69-108, 2003.
- [81]Hantao, L. W., Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente: Aplicações em Lipidômica. Dissertação de Mestrado, UNICAMP., 2011.
- [82]Ryan, D., Morrison, P., Marriot, P., *J. Chromatogr. A*, vol. 1071, pp 47-53, 2005.
- [83]Giddings, J. C., *J. Chromatogr. A*, vol. 703, pp. 3-15, 1995.
- [84]Ferreira, S. L. C., Santos, W. N. L., Quintella, C. M., Neto, B.B., Bosque-Sendra, J. M., *Talanta*, vol.63, pp. 1061-1067, 2004.
- [85]Doehlert, D. H., *Appl. Stat.*, vol. 19, pp.231-236, 1970.
- [86]Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C., *Quim. Nova*, vol. 29, nº 2, pp. 338-350, 2006.
- [87]Ferreira, S.L.C., Queiroz, A. S., Fernandes, M. S., Santos, H. C., *Spectrochim. Acta B*, vol. 57, pp. 1939-1950, 2002.
- [88] Van Den Dool, H., Kratz, P. D., *J. Chromatogr.* , vol. 2, pp. 463-471, 1963.
- [89]FDA:<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>, acessado em 01/11/2011.
- [90]Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P, S., Fundamentos de Cromatografia, Campinas, SP, Editora da UNICAMP, 253 p., 1999, ISBN 85-268-0704-8.
- [91] <http://pt.scribd.com/doc/88598355/108/Tabela-Indice-de-Saponificacao>, acessado em 15/03/2011.
- [92]Neto, B. B., Scarmínio, I. S., Bruns, R. E, *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, 3ª edição, Campinas-SP, Editora da Unicamp, 2007.
- [93]Pedroso, M. P., Projeto e Avaliação de um Modulador Criogênico para Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente, Tese de Doutorado, UNICAMP, 2009.
- [94]Ribani, M. , Bottoli, C. B. G., Collins, C. H.,Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. C., *Quim. Nova*, Vol. 27, pp. 771-780, 2004.
- [95]Pawliszyn, J., Applications of Solid Phase microextraction, Letchworth: Royal Society. of Chemistry, 655 pag., c1999.