

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR
MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME) DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS DE SUCO DE TANGERINA

STEPHANO MARQUES

SÃO CARLOS/SP

2016

STEPHANO MARQUES

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR
MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME) DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS DE SUCO DE TANGERINA

Monografia apresentada ao curso de
Bacharelado em Química - Habilitação:
Tecnológica - Ênfase: Materiais da
Universidade de São Paulo, como
requisito para a obtenção do grau de
Bacharel.

ORIENTADOR:

STANISLAU BOGUSZ JUNIOR

SÃO CARLOS/SP

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades, pela inteligência e pela capacitação de superar os desafios que me permitiram chegar até esta etapa de minha vida.

Agradeço também aos meus pais que possibilitaram a minha estadia na cidade de São Carlos para realizar a graduação e pelo apoio que me deram.

Agradeço ao Professor Stanislaw Bogusz Junior por ter me aceitado como aluno e pela orientação e suporte que me ofereceu durante o trabalho.

Agradeço ao Dr. Paulo Cordeiro pela paciência para me auxiliar e pelas dúvidas tiradas durante o trabalho.

Agradeço aos Professores do Grupo de Química Inorgânica e Analítica e a Central Analítica – CAQI, por disponibilizarem os equipamentos necessários para realização deste trabalho.

Agradeço a Larissa Chirino de Almeida por ter constantemente me auxiliado durante este trabalho.

Agradeço à Silmara França Buchviser e ao Thiago Hideyuki Kobe Ohe pela ajuda nas análises cromatográficas.

E por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos pelas ideias e distrações que tornaram este período muito mais agradável e divertido.

“A simplicidade é o último grau de sofisticação”

Leonardo da Vinci

RESUMO

O Brasil é considerado o quinto maior produtor mundial de tangerinas (*Citrus reticulata*), com aproximadamente 52 mil hectares plantados e produção aproximada anual de 960 mil toneladas, e o estado de São Paulo responde por 38% da produção nacional de tangerinas. Recentemente, o suco de tangerina passou a ser encontrado com mais facilidade no mercado nacional, sendo comercializado na forma de suco integral, suco concentrado congelado adoçado e néctar. Apesar de existirem diversos trabalhos na literatura que tenham se dedicado a investigar a composição dos voláteis importantes para o sabor do suco de tangerina, no melhor do nosso conhecimento, não encontramos publicações que tenham dedicado-se a caracterizar os voláteis importantes para o sabor do suco tangerina integral nacional. O objetivo deste trabalho de pesquisa foi caracterizar os voláteis em suco de tangerina integral através de microextração em fase sólida de *headspace* (HS-SPME) e cromatografia a gás acoplada a detector de ionização em chama (GC-FID) e a detector espectrométrico de massas (GC-MS). Na etapa de extração, três fibras de SPME foram testadas quanto a sua capacidade de extração: PDMS (100 µm polidimetilsiloxano), DVB/CAR/PDMS (50/30 µm divinilbenzeno/carbonxeno/polidimetilsiloxano) e DVB/PDMS (65 µm divinilbenzeno/polidimetilsiloxano). A otimização das condições de extração em termos de tempo e temperatura de extração foi realizada utilizando metodologia de superfície de resposta. Foram identificados por GC-MS 34 compostos voláteis no suco de tangerina integral, majoritariamente terpenos e álcoois, revelando uma composição química complexa.

ABSTRACT

Brazil is considered the fifth largest producer of tangerines (*Citrus reticulata*), with approximately 52 000 hectares and an annual production of about 960 000 tons. The state of São Paulo accounts for 38% of national production of tangerines, which are consumed mainly as fresh fruit. However, recently the tangerine juice is found more easily in the domestic market, as whole juice, sweetened frozen concentrate juice and nectar. Although there are many studies in the literature investigating the composition of the important volatile for the taste of tangerine juice, to the best of our knowledge, we have not found publications devoted to characterizing the important volatile for the taste of the whole tangerine juice from Brazil. Thus, this study aimed to characterize the volatile profile of whole tangerine juice sold in São Carlos, SP, Brazil. For this, we used headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID) and mass spectrometric detector (GC-MS). Three SPME fibers were tested for their extraction capacity: PDMS (polydimethylsiloxane 100 μm), DVB / CAR / PDMS (50/30 μM divinylbenzene / carbonxen / polydimethylsiloxane) and DVB / PDMS (65 μM divinylbenzene / polydimethylsiloxane). The optimization of the extraction conditions in terms of time and temperature of extraction was performed using the response surface methodology. We identified 34 volatiles by GC-MS in the whole tangerine juice, predominantly terpenes, and alcohols.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância (*Analysis of Variance*)

CAR: Carbonxen

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

DVB: Divinilbenzeno

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FID: Detector de Ionização em Chama (*Flame Ionization Detector*)

GC: Cromatógrafo à Gas (*Gas Chromatography*)

HS: *Headspace*

MNMA: Metil-N-metilantranilato

MS: Espectrômetria de Massas (*Mass Spectrometry*)

PDMS: Polidimetilsiloxano

PTFE: Politetrafluoretileno

SPME: Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores, níveis e domínio experimental das condições aplicadas para otimizar a extração por HS-SPME.....	17
Tabela 2 – Experimentos realizados no delineamento composto central rotacional na etapa de otimização das condições de extração dos compostos voláteis em suco integral de tangerina por HS-SPME.....	17
Tabela 3 – Condições experimentais e valores da resposta (área total) obtidas no delineamento composto central rotacional na etapa de otimização das condições de extração dos compostos voláteis em suco integral de tangerina por HS-SPME.....	20
Tabela 4 – Análise da variância (ANOVA) pelo método dos mínimos quadrados, para os parâmetros temperatura e tempo de extração dos compostos voláteis de suco de tangerina por HS-SPME.....	22
Tabela 5 – Compostos voláteis identificados em suco integral de tangerina por HS-SPME e GC-MS.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema para extração de voláteis do suco integral de tangerina por SPME utilizando béquero encamisado com circulação de água.....	15
Figura 2 – Capacidade de extração das fibras de SPME de DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano), (DVB/PDMS) divinilbenzeno/polidimetilsiloxano e PDMS (polidimetilsiloxano), na extração dos compostos voláteis de suco integral de tangerina.....	19
Figura 3 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas no procedimento de extração dos voláteis em suco de tangerina integral por SPME.	20
Figura 4 – Cromatogramas obtidos em GC-MS com os experimentos do delineamento composto central rotacional para otimização da extração dos voláteis em suco integral de tangerina com a fibra de SPME de DVB/CAR/PDMS. Condições cromatográficas conforme descrito no item 3.4 do material e métodos.....	21
Figura 5 – Cromatograma obtido em GC-MS com os experimentos do delineamento composto central rotacional para otimização da extração dos voláteis em suco integral de tangerina com a fibra de SPME de DVB/CAR/PDMS (tempo de extração de 20 min a 22 °C). Condições cromatográficas conforme descrito no item 3.4 do material e métodos.....	22
Figura 6 – Superfície de resposta obtida pelo modelo quadrático: $y = 2,39E+09 + 1,87E+08 \cdot x - 5,02E+08 \cdot x^2 - 1,67E+08 \cdot y - 7,71E+07 \cdot y^2 + 2,14E+07 \cdot x \cdot y + 0$, para a otimização das condições de temperatura de extração (X, °C) e tempo de extração (y, min) dos voláteis suco integral de tangerina por HS-SPME.....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Amostras	14
3.2. Preparo das amostras e procedimentos de SPME	14
3.3. Cromatografia a gás acoplada a detector de ionização em chama (GC-FID)	16
3.4. Cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC-MS)	16
3.5. Estratégia de otimização da extração dos voláteis por SPME	16
3.6. Análises estatísticas.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÕES.....	27
6. REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de citros apresentou um enorme crescimento durante as últimas quatro décadas do século XX, principalmente em função da demanda do mercado por laranjas (*Citrus sinensis*). Entre 1961 e 2001 a produção de laranjas em nível mundial, mais que triplicou, passando de cerca de 18 milhões de toneladas em 1961 para 60 milhões de toneladas em 2001. A produção de laranjas responde por 60% de toda a produção citrícola mundial (Rouseff & Perez-Cacho, 2007) e, segundo Berger (2007), esta fatia de mercado já foi maior no passado, tendo apresentado um recuo de cerca de 10%, não em função de uma diminuição da produção de laranjas, mas sim como resultado de um aumento da produção de tangerinas (*C. reticulata*).

O Brasil é considerado o quinto maior produtor mundial de tangerinas, com aproximadamente 52 mil hectares plantados e produção anual aproximada de 960 mil toneladas (FAO, 2016). O estado de São Paulo responde por 38% desta produção (Teixeira et al., 2014). O cultivo de pomares de tangerineiras desempenha destacado papel econômico e social, pois, segundo dados da FAO (2016), a cultura da tangerineira proporciona aproximadamente 26 mil empregos diretos no país, considerando apenas o cultivo para produção da fruta *in natura*. Além disso, o setor também emprega uma grande quantidade de mão de obra na indústria que processa os frutos para obtenção de suco, néctar, refresco, óleos essenciais, essência aquosa, essência oleosa, pele, semente e bagaço.

Em relação ao comércio de sucos de frutas, o suco de tangerina, recentemente passou a ser encontrado com facilidade no mercado nacional, sendo comercializado principalmente na forma de suco integral. Segundo a legislação brasileira, suco integral é a bebida não concentrada e não diluída composta por 100% de suco sem adição de açúcar, enquanto que néctar é a bebida diluída em água composta por 99% a 25% de suco adoçado podendo ser adicionada de ácidos para correção da acidez; já o refresco é a bebida diluída em água composta por menos de 25% de suco, adicionada de açúcar, ácidos e outros ingredientes (Brasil, 1994; Brasil, 1997; Brasil, 2000; Brasil, 2002).

Dentro da gama de bebidas à base de tangerina existentes no mercado, o suco integral merece destaque especial pela sua grande aceitação e sabor único, bem como pelos benefícios para a saúde que são atribuídos a todos os sucos cítricos (Tietel et al., 2011). A composição química do suco integral de tangerina depende de muitas variáveis que englobam a genética das plantas, condições de cultivo, ausência de doenças na lavoura, estágio de maturação dos frutos, condições de colheita, pós-colheita e armazenamento, além de condições de processamento para obtenção do suco (Rouseff, et al., 2009). Todos estes fatores são importantes para a qualidade sensorial do produto final, pois o sabor do suco processado pode ser facilmente diferenciado pelo consumidor como fresco (quando é obtido a partir de frutas espremidas na hora) ou processado (quando passa por tratamentos térmicos na indústria) (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). É fácil deduzir que o consumidor prefere o suco fresco ao processado, uma vez que, no primeiro o sabor é muito mais agradável. Apesar disso, o processamento do suco de tangerina é necessário, pois o suco fresco é muito instável química, enzimática e microbiologicamente (Rouseff, et al., 2009).

A melhor forma de estabilizar os sucos de tangerina para fins de comercialização é aplicar tratamento térmico após sua obtenção. Entretanto, reações químicas que ocorrem durante o processamento do suco podem resultar em perdas de componentes específicos do sabor que podem alterar o perfil sensorial do produto final (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). O sabor pode ser definido como a combinação de sensações básicas de gosto, aroma e sensação químico-táteis que são percebidas simultaneamente durante a ingestão de alimentos e bebidas (Goff & Klee, 2006). A percepção do gosto ocorre quando os compostos de gosto são diluídos e levados pela saliva em direção aos receptores gustativos localizados nas papilas gustativas da cavidade oral desencadeando a sensação gustativa (Lindemann, 1996). Estes compostos são, na maioria das vezes, não voláteis e englobam uma diversidade de moléculas, incluindo açúcares, sais, ácidos e nucleotídeos. O gosto pode ser dividido em sensações de doce, azedo, salgado, amargo e umami (a sensação dada pelo glutamato monossódico, aminoácidos e compostos relacionados) (Reineccius, 2006). Por outro lado, o aroma é

percebido quando ocorre a interação dos compostos voláteis transportados pelo ar com os receptores olfativos da cavidade nasal (Linthorpe & Taylor, 2006). O aroma é uma sensação muito complexa se comparada ao gosto, pois enquanto existe uma quantidade limitada de compostos químicos capazes de provocar sensações gustativas, mais de 8000 compostos voláteis já foram identificados como potenciais contribuidores para o aroma dos alimentos (Grosch, 2001; Boelens, 2000). Sendo que cada um destes compostos pode potencialmente contribuir para a percepção do aroma, dependendo de suas concentrações, limites sensoriais, volatilidade e interações com a matriz do alimento ou bebida.

O gosto do suco de tangerina é proporcionado pela presença de açúcares como a sacarose, glicose e frutose, ácidos como o cítrico, málico e succínico, além de fenólicos e limonóides que conferem amargor e adstringência (Tietel et al., 2011). Já o aroma fresco e agradável do suco de tangerina provém de uma combinação de diversos compostos voláteis. O aroma do suco de tangerinas não é tão bem conhecido como o de laranja, mas parece ser derivado de uma mistura de voláteis incluindo diversas classes químicas, especialmente terpenos e terpenóides lipossolúveis presentes nos óleos da casca, os quais são transferidos para o suco durante a extração (Pérez-López & Carbonell-Barrachina, 2006).

Do ponto de vista químico e sensorial, a identificação dos compostos voláteis importantes para o sabor de sucos integrais é extremamente importante seja para se conhecer a relação entre a composição química e o sabor de destes sucos, seja para se identificar mudanças no sabor dos sucos em função do processamento ou para avaliar a sua qualidade em pesquisas de desenvolvimento de novos produtos. E, embora existam na literatura trabalhos que tratam da análise do perfil de voláteis em suco de tangerina, em nossa revisão bibliográfica não encontramos nenhum trabalho que tenha se dedicado a investigar os voláteis de suco de tangerina integral nacional.

2. OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi otimizar, por metodologia de superfície de resposta, o procedimento de extração dos voláteis de suco de tangerina integral, utilizando micro-extração em fase sólida de *headspace* (HS-SPME) e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foram adquiridas, no mercado local da cidade de São Carlos - SP, caixinhas de 200 mL de suco de tangerina integral, comercializadas em embalagem Tetra Pack®. Optou-se pela utilização de uma amostra comercial por acreditar-se que esta seria uma amostra mais homogênea. Todas as amostras eram da mesma marca e mesmo fabricante.

3.2. Preparo das amostras e procedimentos de SPME

Alíquotas de 10,3 g (10,0 mL) de suco integral de tangerina foram transferidas, para frascos de 60 mL, dotados de tampa de rosca e septo de PTFE/silicone próprios para extração por SPME. Para aumentar a eficiência de extração, pesou-se 3 g de cloreto de sódio sobre o suco no frasco de extração (efeito *salting out*) conforme descrito por Charve et al., (2011). A mistura era então agitada em vortex por 2 minutos e submetida à extração por SPME em banho termostático utilizando béquer encamisado para um melhor controle da temperatura durante extração. Na Figura 1, pode ser observado o sistema de extração utilizado.



Figura 1. Sistema para extração de voláteis do suco integral de tangerina por SPME utilizando béquer encamisado com circulação de água. Fonte: autoria própria.

Foram testados três materiais de recobrimento de fibras para SPME com a finalidade de se escolher aquele que apresentasse maior capacidade de extração dos voláteis do suco de tangerina integral: 50/30 μm divinilbenzeno/carbonxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), 65 μm divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (DVB/PDMS) e 100 μm polidimetilsiloxano (PDMS). Todas as fibras foram previamente condicionadas antes do uso, segundo as recomendações do fabricante. Para a seleção preliminar, todas as fibras foram testadas a fim de selecionar a que apresentasse a melhor capacidade de captura dos voláteis do suco integral de tangerina. Nesta etapa, todas as fibras foram expostas ao *headspace* da amostra sob as seguintes condições: tempo de equilíbrio de 10 min, tempo de extração 30 min, temperatura de extração 40 °C. Estas condições foram arbitrariamente estabelecidas apenas para a etapa de escolha da fibra. Após a extração, as fibras eram introduzidas no injetor do cromatógrafo a gás para dessorção dos analitos a uma temperatura de 250 °C, em modo *splitless*, por um período de 1,0 min. Após o procedimento de extração e dessorção, as fibras eram recondicionadas por 15 min a 250 °C. O procedimento de recondicionamento das fibras foi realizado para garantir a inexistência de picos nos brancos de

corrida e a boa qualidade dos procedimentos de extração por SPME. Todas as fibras foram testadas em triplicata e os resultados apresentados representam as médias das mesmas.

3.3. Cromatografia a gás acoplada a detector de ionização em chama (GC-FID)

Como o conhecimento da identidade dos compostos não era necessário na etapa de escolha da fibra, e devido a excelente estabilidade e facilidade de operação do detector de ionização em chama (FID, “*Flame Ionization Detector*”), esta primeira etapa do trabalho foi realizada em um cromatógrafo a gás, marca Shimadzu modelo GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japão) dotado de um detector do tipo FID. As condições cromatográficas foram: injetor a 250 °C, modo *splitless* (1,0 min); gás de arraste nitrogênio a 1,0 mL min⁻¹; rampa de temperatura do forno: 40 °C, com incremento de 3 °C min⁻¹ até 220 °C; detector 250 °C. Os voláteis foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida SLB (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm).

3.4. Cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC-MS)

Para a separação e identificação dos voláteis foi utilizado um GC-MS Shimadzu modelo GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão), coluna capilar de sílica fundida HP – FFAP (50 m x 0,2 mm d.i. x 0,33 µm), e as seguintes condições cromatográficas: injetor: modo *splitless* por 1,0 min, a 250 °C; gás de arraste hélio a 1,0 mL min⁻¹; rampa de temperatura do forno: 40 °C, com incremento de 3 °C min⁻¹ até 220 °C; temperatura de interface: 240 °C, fonte de ionização por elétrons +70 eV, 35-350 m/z. A identificação tentativa dos voláteis foi realizada com base nas comparações dos espectros de massa obtidos com as amostras e os espectros de massa da NIST 2008, com similaridade mínima de 80%.

3.5. Estratégia de otimização da extração dos voláteis por SPME

Uma vez escolhida a fibra com a maior capacidade de extração dos voláteis do suco integral de tangerina, para esta, foram otimizadas as condições de extração através de um delineamento composto central rotacional (DCCR), baseado num planejamento fatorial 2², com quatro pontos axiais ($\alpha = 1,41$) e três repetições no ponto central (Bogusz et al., 2011). A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de resposta, é uma

ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (Rodrigues & lemma, 2005). Além de reduzir o número de experimentos necessários, também possibilita a análise dos fatores concomitantemente, o que resulta na possibilidade de otimizá-los simultaneamente. As variáveis otimizadas foram tempo de extração (t, min) e temperatura de extração (T, °C), os níveis de cada variável investigada podem ser visualizados na Tabela 1. No total, onze experimentos foram realizados de forma aleatória, os quais são descritos na Tabela 2.

Tabela 1. Fatores, níveis e domínio experimental das condições aplicadas para otimizar a extração por HS-SPME.

Variáveis	Variáveis codificadas				
	$-\alpha$	-1	0	1	α^a
Temperatura de extração (T, °C)	22	25	33	40	43
Tempo de extração (t. ext., min)	6	10	20	30	34

^a $\alpha = 1,41$

Tabela 2. Experimentos realizados no delineamento composto central rotacional na etapa de otimização das condições de extração dos compostos voláteis em suco integral de tangerina por HS-SPME.

Ensaio	Tempo de extração	Temperatura de extração
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

3.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas empregando o software Statistica v .13 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 podem ser observados os valores médios de área total para cada uma das fibras testadas. No presente estudo a fibra de DVB/CAR/PDMS foi a que apresentou a melhor capacidade de captura dos voláteis do suco integral de tangerina. Este resultado está de acordo com outros trabalhos na literatura que também relatam o uso da fibra mista DVB/CAR/PDMS como uma das mais adequadas ao estudo de voláteis em frutos frescos (Bogusz et al., 2011; Pedroso et al., 2011; Carasek e Pawliszyn, 2006). A seleção do revestimento das fibras de SPME é baseada no princípio do “semelhante dissolve semelhante”, de modo que a fibra mista de DVB/CAR/PDMS, possivelmente por reunir materiais de diferentes polaridades, foi capaz de extrair uma maior quantidade de compostos voláteis. Ademais, a polaridade da fibra mista DVB/CAR/PDMS também está associada à existência de meso-macroporos em sua estrutura, que resulta da rugosidade do filme líquido de PDMS, associado aos poros sólidos do Carboxen e Divinilbenzeno. Além disso, se considerarmos a polaridade dos materiais de recobrimento das fibras utilizadas neste experimento, é possível verificar que o PDMS é o menos polar, seguido das misturas DVD/PDMS e DVB/CAR/PDMS.

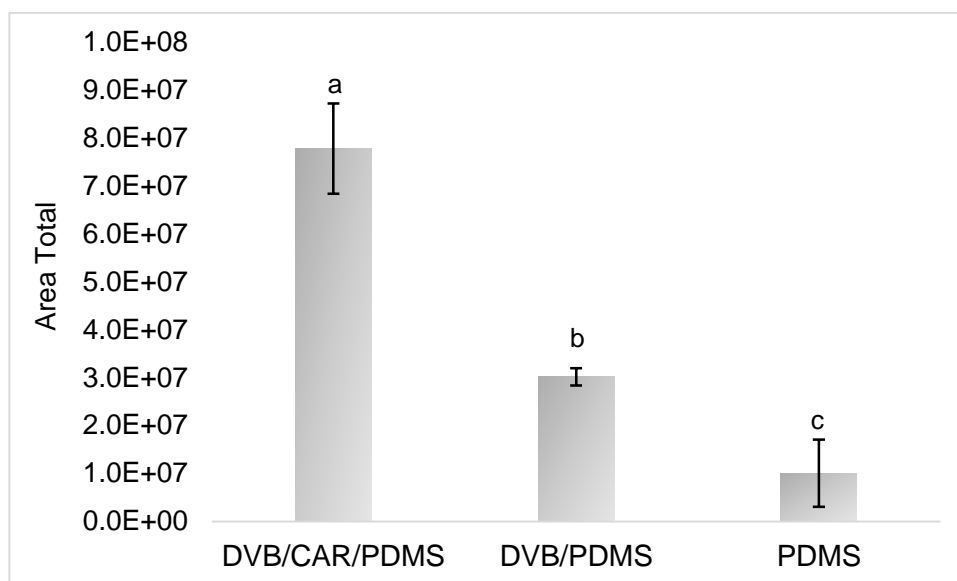


Figura 2. Capacidade de extração das fibras de SPME de DVB/CAR/PDMS, DVB/PDMS, e PDMS, na extração dos compostos voláteis de suco integral de tangerina. O resultado é expresso como média das triplicatas de área total dos voláteis extraídos pelas fibras obtidas no GC-FID. Condições de extração: tempo de extração 30 min e temperatura de extração 40 °C. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativa a $p < 0,05$ por Tukey.

Na Figura 3 pode ser observado o diagrama de Pareto, na qual estão resumidos os resultados obtidos como o delineamento experimental. Nele, é possível observar que todos os parâmetros estudados foram significativos ($p > 0,05$), exceto a interação entre as variáveis tempo e temperatura de extração. Com base nestas informações os fatores foram utilizados para o delineamento experimental com o intuito de se obter as melhores condições de temperatura de extração e tempo de exposição da fibra ao *headspace* da amostra. Além disso, também foram realizados experimentos no ponto central ($n=3$), a fim de estimar o erro puro e verificar possível falta de ajuste no modelo.

Na Tabela 3, podem ser encontradas as respostas de área total dos cromatogramas obtidos na etapa de otimização e na Figura 4 os respectivos cromatogramas. É possível observar que as condições de extração que forneceram os maiores valores de área total foram a temperatura de extração de 22 °C e o tempo de extração de 20 min. Pode-se destacar que o fato de existir uma maior eficiência de extração, em uma temperatura de extração inferior a 40 °C é uma vantagem, pois temperaturas muito elevadas durante a extração podem levar a degradações dos voláteis da amostra.

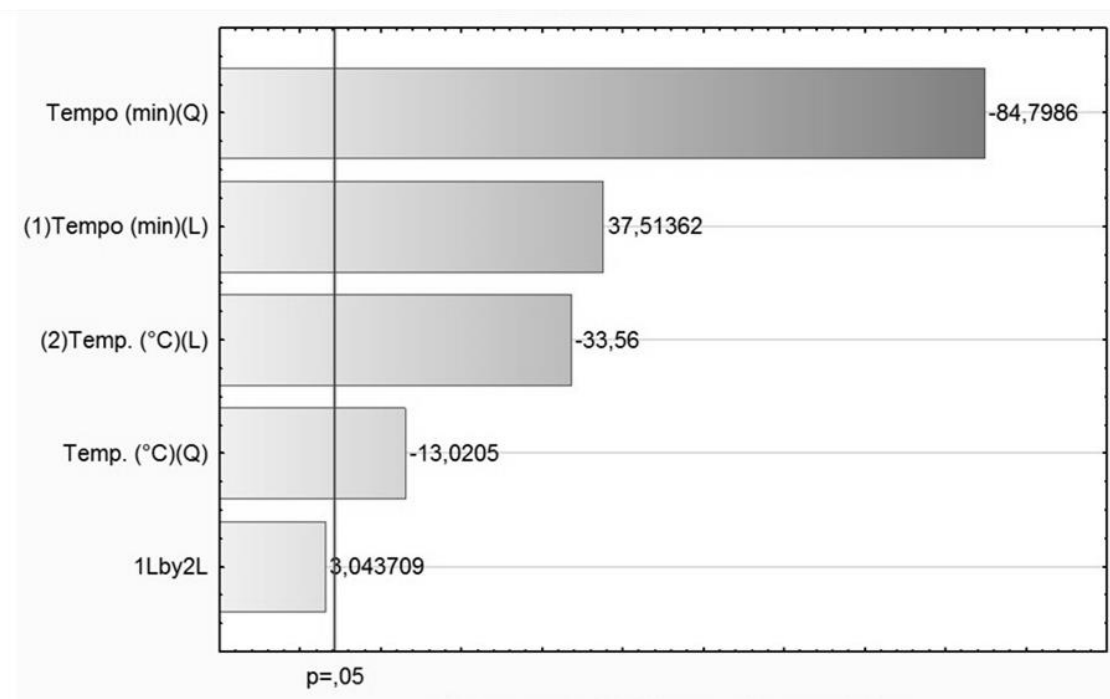


Figura 3. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas no procedimento de extração dos voláteis em suco de tangerina integral por SPME. Resposta: área total, 2 fatores, 1 bloco, 11 experimentos, erro puro $1,98E+14$.

Tabela 3. Condições experimentais e valores das respostas (área total) obtidas no delineamento composto central rotacional na etapa de otimização das condições de extração dos compostos voláteis em suco integral de tangerina por HS-SPME.

Ensaio	Tempo (min)	Tempo de extração	Temp. (°C)	Temperatura de extração	Resposta (Area total) ^a
1	-1	10	-1	25	2,15E+09
2	1	30	-1	25	2,09E+09
3	-1	10	1	40	2,08E+09
4	1	30	1	40	2,11E+09
5	-1,41	6	0	33	5,55E+08
6	1,41	34	0	33	1,63E+09
7	0	20	-1,41	22	2,40E+09
8	0	20	1,41	43	1,49E+09
9	0	20	0	33	2,39E+09
10	0	20	0	33	2,38E+09
11	0	20	0	33	2,40E+09

^a Área total expressa em unidades arbitrárias

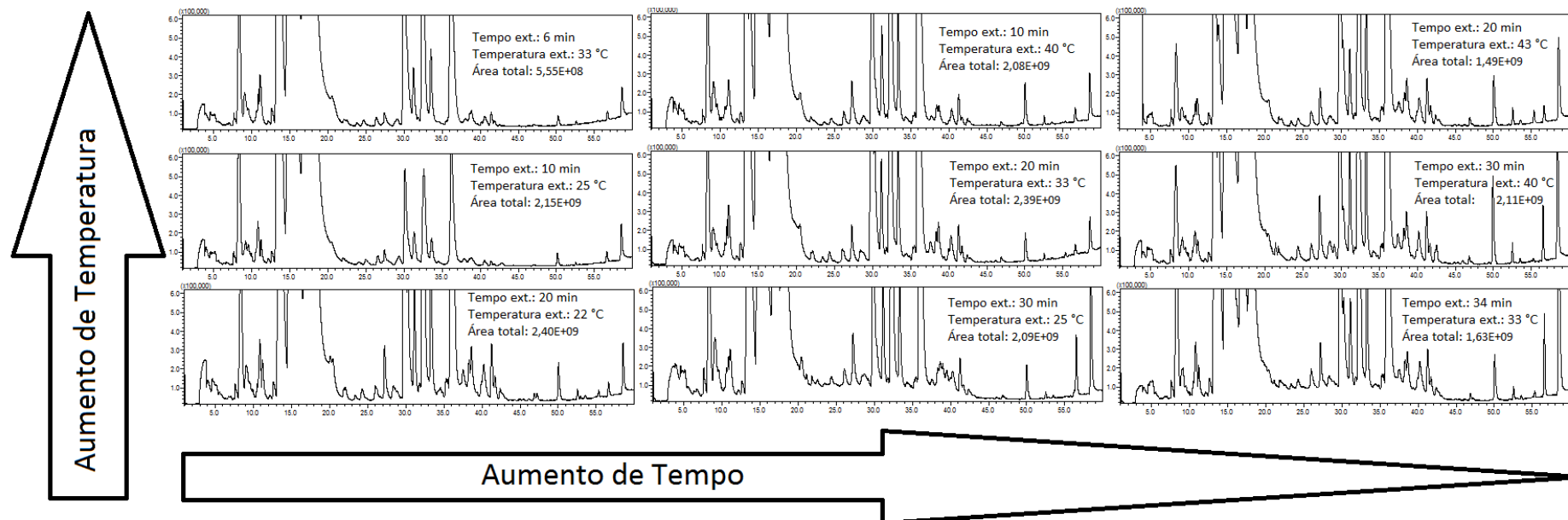


Figura 4. Cromatogramas obtidos em GC-MS com os experimentos do delineamento composto central rotacional para otimização da extração dos voláteis em suco integral de tangerina com a fibra de SPME de DVB/CAR/PDMS. Condições cromatográficas conforme descrito no item 3.4 do material e métodos.

Na Figura 5 é apresentado um cromatograma dos voláteis extraídos sob esta condição de extração.

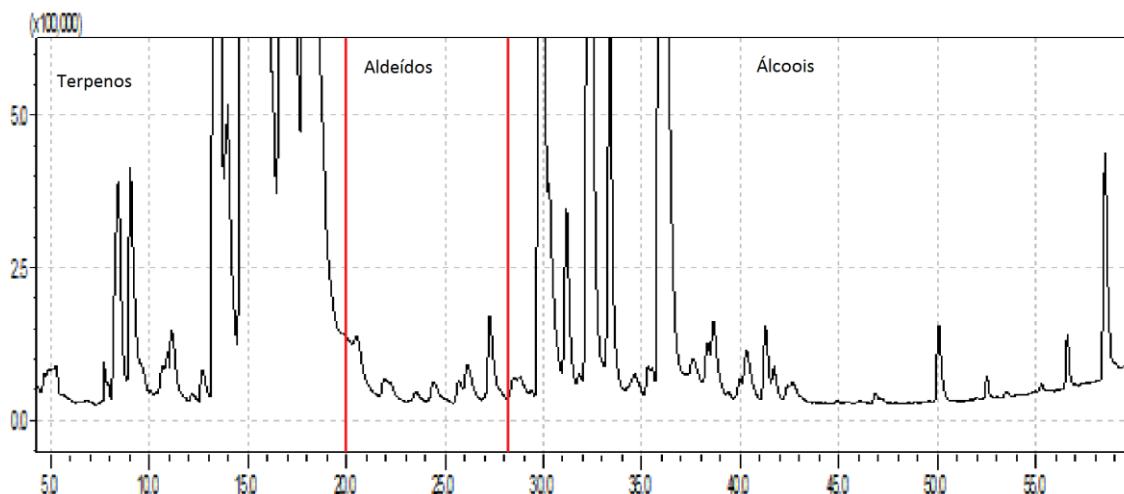


Figura 5. Cromatograma obtido em GC-MS com os experimentos do delineamento composto central rotacional para otimização da extração dos voláteis em suco integral de tangerina com a fibra de SPME de DVB/CAR/PDMS (tempo de extração de 20 min a 22 °C). Condições cromatográficas conforme descrito no item 3.4 do material e métodos.

Tabela 4. Análise da variância (ANOVA) pelo método dos mínimos quadrados, para os parâmetros temperatura e tempo de extração dos compostos voláteis de suco de tangerina por HS-SPME.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Media dos quadrados	F_{cal}	F_{tab}	F_{cal}/F_{tab}
Regressão	1,96E+18	5	3,92E+17	1,66	5,05	0,33
Resíduos	1,18E+18	5	2,36E+17			
Falta de ajuste	1,18E+18	3	3,93E+17	1987,08	19,16	103,71
Erro puro	3,96E+14	2	1,98E+14			
Total	3,14E+18	10				
R^2	0,62					

% variação explicada: 62,4 %

Na Tabela 4, encontram-se os resultados de ANOVA para o delineamento composto central rotacional, nesta verifica-se que a significância estatística da regressão dada pela razão entre a média dos quadrados da regressão pela média quadrática dos resíduos (MQ_R/MQ_r) ou $F_{calculado}$, é de 1,66; e que, quando comparado ao nível de significância de 95% com o valor

de F_{tabulado} (5, 5, 95%); que neste caso é de 5,05, verifica-se que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$ cerca de 0,33 vezes, o que indica a inexistência de uma adequada correlação entre as variáveis estudadas. Ao se analisar a significância estatística da falta de ajuste do modelo, dada pela razão entre a média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro ($MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$); que para um bom ajuste do modelo deve apresentar $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabulado}}$, verifica-se, como já era esperado, que o modelo obtido apresenta falta de ajuste aos resultados experimentais, o que impossibilita fazer previsões sobre a resposta (valores de área total) para outras temperaturas e outros tempos de extração, com base no modelo obtido. Embora se tenha verificado uma baixa correlação entre as variáveis estudadas e falta de ajuste no modelo obtido, os resultados encontrados através dos experimentos realizados são reais e válidos, e portanto, a condição ótima obtida de temperatura de extração e tempo de exposição pode ser utilizada uma vez que fornece os maiores valores de área total nos cromatogramas de suco de tangerina integral. Destaca-se que o desvio padrão relativo (CV%) para os valores de área total obtidos no ponto central do DCCR foi de 12% indicando uma aceitável repetibilidade do método desenvolvido nesta condição.

A superfície de resposta obtida no delineamento composto central rotacional com os valores ótimos de temperatura de extração de 22 °C e tempo de extração de 20 minutos pode ser observada na Figura 6.

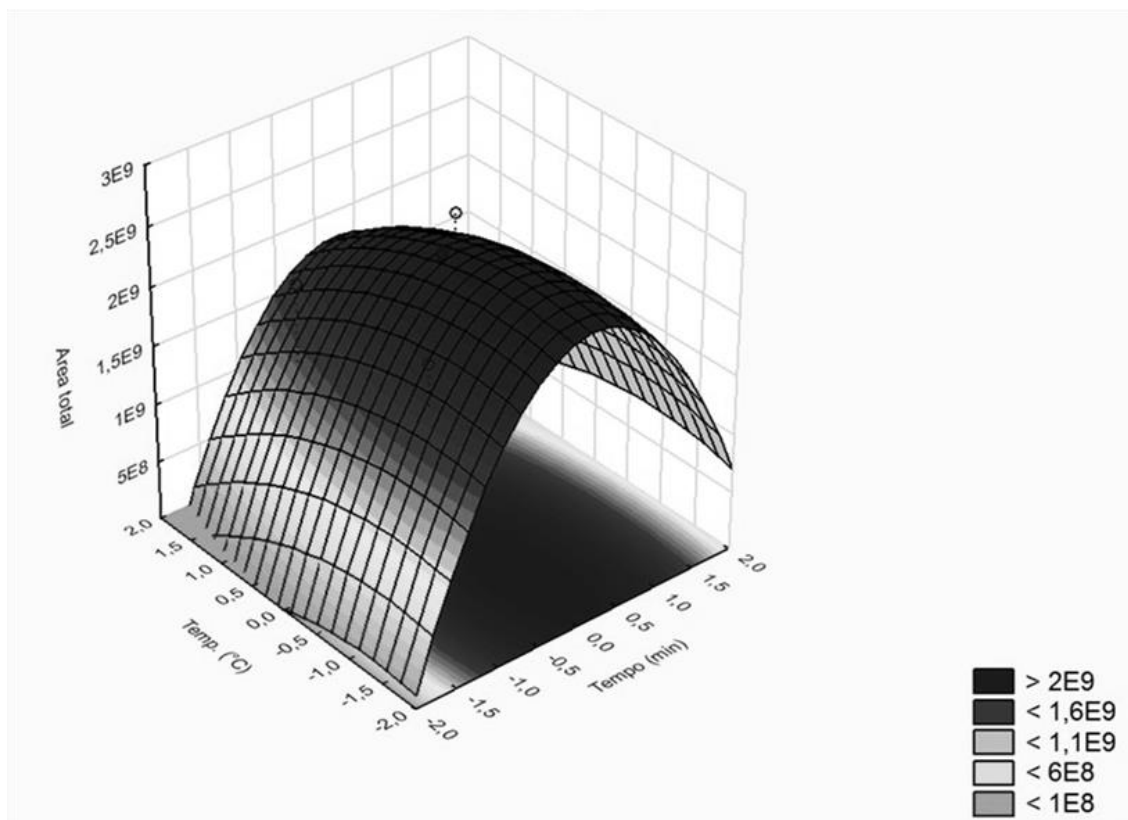


Figura 6. Superfície de resposta obtida pelo modelo quadrático: $y = 2,39E+09 + 1,87E+08 \cdot x - 5,02E+08 \cdot x^2 - 1,67E+08 \cdot y - 7,71E+07 \cdot y^2 + 2,14E+07 \cdot x \cdot y + 0$, para a otimização das condições de temperatura de extração (X, °C) e tempo de extração (y, min) dos voláteis suco integral de tangerina por HS-SPME.

Na Tabela 5, encontram-se os resultados da comparação da eficiência de extração de cada fibra testados sob as condições descritas no ponto central do DCCR para o suco integral de tangerina por GC-MS. Diversas classes químicas foram encontradas, como álcoois, aldeídos, cetona, ésteres, hidrocarbonetos e terpenos. A fibra que extraiu a maior quantidade de compostos foi DVB/CAR/PDMS, seguida pela DVB/PDMS e PDMS.

Tabela 5. Voláteis identificados em suco integral de tangerina por HS-SPME e GC-MS.

Composto	CAS	Odor	Limite de Percepção (µg/L)	DVB/CAR/PDMS	DVB/PDMS	PDM S
Álcoois						
3-Caren-2-ol	-	-	-	x		
Linalool ^a	78-70-6	Floral, verde, cítrico	6	x	x	x
1-Octanol ^b	111-87-5	Laranja verde	190	x	x	
Fenchol	1632-73-1	Cânfora, limão	1.000	x	x	x
Terpinen-4-ol ^c	562-74-3	Amadeirado, terra	30.000	x	x	x
β-Terpineol	138-87-4	Amadeirado, terra	-	x	x	x
α-Terpineol ^c	98-55-5	Cítrico, violeta	280	x	x	x
Citronelol ^d	106-22-9	Cítrico, rosa, floral	500	x	x	x
Nerol	106-25-2	Cítrico, doce, limão	680	x	x	x
Carveol	99-48-9	Hortelã, cominho	4.000	x	x	x
Aldeídos						
Hexanal ^d	66-25-1	Gramma, sebo, gordura	4,0	x	x	
Octanal ^a	124-13-0	Limão, verde, gordura	1,4	x	x	
Nonanal ^e	124-19-6	Cítrico, verde	1,0	x	x	x
Furfural	98-01-1	Pão, amêndoa	280	x	x	
Decanal ^a	112-31-2	Casca de laranja	9,0	x	x	x
Perillaldeído ^d	2111-75-3	Condimento, herbáceo	30	x	x	x
Cetona						
Carvona ^d	99-49-0	Hortelã	7	x	x	x
Ésteres						
Butanoato de etila	105-54-4	Frutado	0,001	x	x	x
Octanoato de etila	106-32-1	Frutado, damasco	5	x	x	x
Neril acetato ^d	141-12-8	Cítrico, verde	10	x	x	
Dimetil antranilato	134-20-3	Tangerina, mel	0,06	x	x	x
Terpenos						
α-Tujeno ^b	2867-05-2	Amadeirado, verde	-			x
α-Pineno ^c	80-56-8	Pinho	2.5	x	x	
β-Felandreno	99-83-2	Menta, terpênico	-	x	x	
β-Pineno ^c	127-91-3	Amadeirado	140	X	x	x
Carvomenteno	5502-88-5	-	-	X		
3-Careno ^d	13466-78-9	Canforaceo, doce,	20	X	x	x
α-Mirceno ^a	1686-30-2	Balsâmico, doce	5000	X		
α-Terpineno ^e	99-86-5	Limão, amadeirado	5000	X	x	x
Limoneno ^c	138-86-3	Cítrico, frescor	13.700	X	x	x
γ-Terpineno ^b	99-85-4	Limão, cítrico	3.260	X	x	x
Terpinoleno ^e	586-62-9	Cítrico, pinho	-	X		
Ocimenos	673-84-7	Herbáceo	40.000	X		
p-Cimeno	99-87-6	Cítrico, limão	1.000	X	x	

^aOhta et al., 1982; ^bGoldenberg et al., 2016; ^cPérez-López et al., 2006; ^dTietel et al., 2011;^eObenland et al., 2013

No total, 34 compostos diferentes foram tentativamente identificados na fração volátil da amostra (identificação de 79% do cromatograma), subdivididos em 6 classes químicas diferentes: 13 terpenos, 10 álcoois, 6 aldeídos, 4 ésteres e uma cetona. Esta quantidade de compostos identificada está em acordância com o encontrado por Perez et al. (2006) que identificaram 32 voláteis em tangerinas do tipo Hernandina, mas é menor que o reportado por Dharmawan et al., (2007) que identificaram 41 voláteis em suco de tangerinas do tipo *Citrus reticulata* Blanco, cv. Dalandan.

O primeiro estudo abrangente destinado a elucidar a natureza do aroma do suco de tangerina foi conduzido por Moshonas & Shaw (1997). Estes autores geraram um banco de dados a partir do suco de 15 diferentes cultivares de tangerinas e listaram 42 constituintes voláteis importantes para o sabor das da fruta, com destaque para o constituintes voláteis mirceno, limoneno, linalol e γ -terpineno, compostos estes que também foram encontrados no presente estudo. Elmaci & Altug (2005), utilizando GC-MS também identificaram os compostos γ -terpineno, p-cimeno, α -pineno e α -terpinoleno como os voláteis mais abundantes em tangerinas turcas. Estes mesmos autores também relataram que o limoneno e γ -terpineno eram responsáveis por aproximadamente 88% dos voláteis nas tangerinas por eles analisadas.

Em outro trabalho, Pérez-Lopez et al., (2006) quantificaram 12 voláteis do aroma do suco de duas variedades de tangerinas espanholas e concluíram que o limoneno, mirceno, sabineno, α -pineno e linalol foram os compostos predominantes nestes sucos. Além disso, eles sugeriram que o limoneno, linalol, α -terpineol e terpinen-4-ol podem ser utilizados como parâmetros de controle de qualidade em sucos de tangerina, uma vez que o conteúdo de α -terpineol e terpinen-4-ol podem aumentar em sucos processados de modo que este aumento diminui a aceitação dos sucos. Finalmente, Barboni et al. (2009) quantificaram 44 aromas voláteis em sucos de várias tangerinas híbridas, e sugeriu que as razão entre o conteúdo de limoneno e γ -terpineno poderia ser usada para discriminar diferentes híbridos de cruzamentos entre tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) e Clementine (*Citrus reticulata* \times *Citrus sinensis*). Embora no presente estudo não tenha sido realizada uma investigação

quantitativa, foi possível identificar o α -terpineol e terpinen-4-ol, de modo que a metodologia aqui desenvolvida e otimizada pode ser aplicada em trabalhos futuros para avaliação da qualidade de sucos processados de tangerina.

5. CONCLUSÕES

A fibra de SPME que apresentou maior capacidade de extração dos compostos voláteis em suco integral de tangerina foi a fibra tripla DVB/CAR/PDMS. A otimização multivariada das condições de extração permitiu conhecer os melhores valores de tempo e temperatura para extração. Os resultados da identificação tentativa por GC-MS dos voláteis obtidos, nas condições de extração otimizada, revelaram uma composição química complexa com 34 componentes, predominantemente terpenos e álcoois.

6. REFERÊNCIAS

- Barboni, T.; Luro, F.; Chiaramonti, N.; Desjobert, J.M.; Muselli, A.; Costa, J. Volatile composition of hybrids Citrus juices by headspace solidphase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2009, 116, 382–390.
- Berger, R. G. Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability. Springer: Berlin Heidelberg, 2007. ISBN: 978-3-540-49338-9.
- Boelens, M. H. Volatile compounds in food-database (from Volatile Compounds in Food, Qualitative and Quantitative Data, 7th ed., (1996), Supplement 1 (1997) and Supplement 2 (1999), TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands, 2000.
- Bogusz, S.; Melo, A. M. T.; Zini, C. A.; Godoy, H. T. Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 3345–3350. DOI:10.1016/j.chroma.2010.12.060
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 3.510, de 16 de junho de 2000. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 8.918, de 14 de Julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da comissão intersetorial de bebidas e dá outras providências.

Brasil. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. A Diretoria Colegiada da ANVISA/MS aprova o regulamento técnico para rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial da União. 2002; 23 set; (184):33; Seção 1.

Carasek, E.; Pawliszyn, J. Screening of Tropical Fruit Volatile Compounds Using Solid-Phase Microextraction (SPME) Fibers and Internally Cooled SPME Fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 23, 8688–8696.

Charve, J.; Chen, C.; Hegeman, A.D.; Reineccius, G. A. Evaluation of instrumental methods for the untargeted analysis of chemical stimuli of orange juice flavour. *Flavour and Fragrance Journal*, 2011, 26, 429–440. DOI 10.1002/ffj.2078

Dharmawan, J.; Kasapis, S.; Curran, P.; Johnson, J.R. Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I. Freshly-squeezed juice. *Flavor and Fragrance Journal*, 2007, 22, 228–232.

Elmaci, Y.; Altug, T. Flavor characterization of three mandarin cultivars (Satsuma, Bodrum, Clementine) by using GC/MS and flavor profile analysis techniques. *Journal of Food Quality*, 2005, 28, 163 -170.

FAO - Food and Agriculture Organization. Faostat: Statistical database. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>> Acesso em: 14 junho de 2016.

Goff, S.A.; Klee, H.J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value? *Science*, 2006, 311, 815–819.

Goldenberg, L.; Yaniv, Y.; Doron-Faigenboim, A.; Carmi, N.; Porat, R. Diversity among mandarin varieties and natural sub-groups in aroma volatiles

compositions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016; 96: 57–65. DOI 10.1002/jsfa.7191.

Grosch W. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Senses*, 2001; 26, 533-45.

Lindemann, B. Taste reception. *Physiological Reviews*, 1996, 76, 719-766.

Linforth, R.; Taylor, A. 2006. The process of flavour release. In: Voilley, A. & Etiévant, P., editors. *Flavour in food*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd. p. 287-307.

Moshonas, M.G.; Shaw, P.E. Quantification of volatile constituents in mandarin juices and its use for comparison with orange juices by multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 3968–3972.

Obenland, D.; Collin, S.; Sievertb, J.; Arpaiab, M. L. Mandarin flavor and aroma volatile composition are strongly influenced by holding temperature. *Postharvest Biology and Technology* 82 (2013) 6–14.

Ohta, H.; Tonohara, K.; Watanabe, A.; Iino, K.; Kimura, S. Flavor Specificities of Satsuma Mandarin Juice Extracted by a New-type Screw Press Extraction System, *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46:5, 385-1386. DOI: 10.1080/00021369.1982.10865252.

Pedroso, M.P.; Ferreira, E.C.; Hantao, L.W.; Bogusz JR.S ; Augusto, F. Identification of volatiles from pineapple pulp (*Ananas comosus* L.) by comprehensive two-dimensional gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2011, 34, 1-8.

Perez-Cacho, P. R & Rouseff, R. L. Processing and storage effects on orange juice aroma: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 9785-9796. DOI: 10.1080/10408390701638902

Perez-Lopez, A.G.; Carbonell-Barrachina, A.A. Volatile odour components and sensory quality of fresh and processed mandarin juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86, 2404–2411.

Pérez-López, A.G.; Saura, D.; Lorente, J.; Carbonell-Barrachina, A.A. Limonene, linalool, α-terpineol, and terpinen-4-ol as quality control parameters in mandarin

juice processing. *European Food Research and Technology*, 2006, 222, 281–285.

Reineccius, G. A. *Flavor chemistry and technology*. 2006. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de processos – Uma estratégia seqüencial de planejamentos*. Campinas: Casa do Pão, 2005.

Rouseff, R. and Perez-Cacho, P.R. Citrus Flavour, in: Berger, R. G. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer: Berlin Heidelberg, 2007. ISBN: 978-3-540-49338-9.

Rouseff, R. L., Ruiz Perez-Cacho, P., Jabalpurwala, F. Historical review of citrus flavor research during the past 100 years. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, 8115-8124. DOI:10.1021/jf900112y

Teixeira, J.P.F.; Marques, M.O.M.; Pio, R.M. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. *Citrus Research & Technology*, Cordeirópolis, 2014, 35, 1, 1-10. DOI: 10.5935/2236-3122.20140001.

Tietel, Z.; Plotto, A.; Fallik, E.; Lewinsohn, E.; Porat, R. Taste and aroma of fresh and stored mandarins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011; 91, 14–23. DOI: 10.1002/jsfa.4146.