

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

Departamento de Química e Bioquímica

Rui César Gonçalves Ferreira

Mestrado em Ciências e Tecnologia do Ambiente

Resumo

Neste trabalho recorreu-se a um processo de extração desenvolvido recentemente, a Microextração por Difusão Gasosa (GDME), para a extração de compostos voláteis e semi-voláteis diretamente em amostras sólidas. Nesta técnica a extração dos analitos é realizada utilizando um módulo em Teflon de dimensão reduzida com uma membrana microporosa hidrofóbica no seu fundo. A membrana impede a passagem de líquido hidrofílico solvente mas permite a difusão dos compostos voláteis. Este processo é bastante simples, visto que apenas num passo se consegue realizar a extração, concentrar o analito e realizar uma reação de derivatização dos compostos recolhidos. A deteção e separação dos compostos foi efetuada com recurso à cromatografia líquida de alta eficiência e à radiação UV. A Microextração por Difusão Gasosa foi recentemente patenteada e o seu uso até agora focava-se em extrações *in situ* de amostras líquidas, especialmente bebidas alcoólicas.

Ao longo deste trabalho estudaram-se duas amostras sólidas: o pão e a cortiça. No primeiro caso o objetivo foi quantificar diferentes compostos voláteis existentes no pão, caso do diacetilo, 2,3-pentanodiona e 2,3-hexanodiona. Inicialmente realizaram-se vários testes de otimização do processo de extração abrangendo parâmetros experimentais como a temperatura, o tempo de extração, o volume e a concentração da solução aceitadora, entre outros. No final, concluiu-se que era possível quantificar os compostos α -dicarbonílicos em diferentes tipos de pão, havendo variação na presença desses compostos de amostra para amostra.

No caso da cortiça, o objetivo foi acompanhar a variação de aldeídos simples ao longo do processo de produção de uma rolha. Foram estudados todos os passos, desde a chegada de uma placa de cortiça à fábrica até ao produto final. Foram encontrados vários aldeídos simples em diferentes quantidades nos vários passos de fabrico de uma rolha de cortiça. O furfural apresentou as variações mais significativas ao longo do processo, surgindo apenas a partir da cozedura, presumivelmente devido aos efeitos de degradação térmica que ocorrem no passo referido.

Palavras-chave: microextração por difusão gasosa, diacetilo, α -dicarbonílicos, aldeídos, cortiça, pão

Abstract

In this work a recently developed process of extraction was used, Gas-Diffusion Microextraction (GDME), for the determination of volatile and semi-volatile compounds in solid sample. In this technique a module of reduced size made of Teflon with a hydrophobic microporous membrane at its bottom is used. The membrane prevents the passage of solvent but allows diffusion of volatile compounds. This process is very simple since in only one step is accomplished the extraction, the concentration of the analyte and a derivatization reaction of the compounds extracted. Detection and separation of compounds were made using high performance liquid chromatography and UV light. GDME was recently patented and so far it was focused on *in situ* extraction of liquid samples, especially alcoholic beverages.

Throughout this work two solid samples were studied, bread and cork. In the first case, our aim was to quantify the amounts of diacetyl, 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione in different types of bread. Initially several optimization tests of the extraction process were made including experimental parameters such as temperature, extraction time, volume and concentration of the acceptor solution, among others. In the end, it was concluded that it was possible to quantify the amount of α -dicarbonyl compounds in different types of bread, being detected a variation in the presence of such compounds from sample to sample.

As for cork, the objective was to monitor the variation of simple aldehydes during the process of industrial a cork stopper production. All main production steps have been performed, beginning at the arrival of cork in its original state until the corks leave the factory as a final product. Aldehydes were found in varying amounts in different manufacturing steps of a cork. Furfural had the main significant change in the process. It appears only during the cooking step probably due to thermal degradation effects that occur in such procedure.

Key words: gas-diffusion microextraction, diacetyl, α -dicarbonyl compounds, aldehydes, bread, cork

Índice geral

Resumo.....	II
Abstract.....	III
Índice geral.....	IV-V
Índice de figuras.....	VI-VII
Índice de tabelas,.....	VIII
Índice de abreviaturas.....	IX
I – INTRODUÇÃO	1
1 – O Pão.....	1
2 – A Cortiça.....	2
3 - Compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis	4
3.1 – Compostos α -dicarbonílicos	5
3.2 – Aldeídos	2
4 – Microextração por difusão gasosa (GDME).....	8
4.1 – Funcionamento e princípios do processo de extração	9
4.2 – Reação de derivatização	10
4.2.1 – Reação de derivatização de compostos α -dicarbonílicos com o- fenilenodiamina (OFDA).....	11
4.2.2 – Reação de derivatização dos aldeídos com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).....	11
5 – Amostras líquidas estudadas recentemente com recurso à GDME e técnicas utilizadas em amostras sólidas	12
5.1 - Amostras líquidas.....	12
5.2 – Amostras sólidas	12
II - MATERIAL E MÉTODOS.....	14
6 – Equipamentos e material utilizado	14
7 – Reagentes utilizados e preparação de soluções	16
7.1 – Preparação de soluções para o trabalho da quantificação de compostos α - dicarbonílicos no pão.....	17
7.2 – Condições cromatográficas utilizadas para o trabalho da quantificação de compostos α -dicarbonílicos no pão	17
7.3 – Preparação de soluções para o trabalho das rolhas de cortiça	18
7.4 – Condições cromatográficas utilizadas para o trabalho da evolução dos aldeídos em rolhas de cortiça.....	18

8 – Procedimentos de extração.....	19
8.1 – Procedimento geral de extração para o pão	19
8.2 - Procedimento geral de extração dos vários aldeídos da cortiça	19
III – Resultados	19
A – Estudo dos compostos α -dicarbonílicos no pão.....	19
9 – Estudo e otimização dos parâmetros que influenciam o processo de extração do pão	19
9.1 – Estudo da temperatura de extração	20
9.2 – Efeito da variação de volume da solução aceitadora	21
9.3 – Efeito do tempo de extração.....	22
9.4 – Diferença entre o módulo mergulhado e o módulo em <i>headspace</i>	23
9.5 – Influência do efeito da agitação.....	24
9.6 - Validação da metodologia.....	24
9.7 - Aplicabilidade em amostras reais	25
9.8 - Efeito da variação do teor dos compostos α -dicarbonílicos no pão ao longo de quatro dias	27
B – Determinação de aldeídos em cortiça.....	28
10 – Estudo e otimização dos parâmetros que influenciam o processo de extração na cortiça	28
10.1 – Influência do tempo de extração.....	28
10.2 – Influência da temperatura de extração	29
10.3 – Influência da variação de volume da solução aceitadora, DNPH.....	30
10.4 – Variação da concentração de aldeídos nos diferentes passos da formação de uma rolha de cortiça	30
10.5 – Composição de 3 tipos de aglomerados diferentes.....	356
IV – CONCLUSÕES.....	367
V – TRABALHO FUTURO	378
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	389

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Representação esquemática do processo de fabrico de rolhas de cortiça.....	3
Figura 3.1 - Representação esquemática do processo de formação do diacetilo.....	5
Figura 4.1 - Representação esquemática do processo de extração para amostras sólidas usado no GDME.....	10
Figura 4.2 – Esquema que representa a reação de derivatização entre a OFDA e os compostos α -dicarbonílicos dando origem a quinoxalinas.....	11
Figura 4.3 – Equação que representa a reação de derivatização entre DNPH e compostos dicarbonilos.....	12
Figura 9.1 - Gráfico representativo da variação das áreas dos picos dos compostos α -dicarbonílicos em função da temperatura de extração. O tempo utilizado foi 15 min. O volume da solução aceitadora 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, foi 0,5 mL....	20
Figura 9.2 - Gráfico representativo da variação das áreas dos picos dos compostos α -dicarbonílicos em função do volume da solução aceitadora. Os volumes testados foram 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,7 mL. O tempo utilizado foi 15 min. O volume da solução aceitadora 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, foi 0,5 mL	21
Figura 9.3 - Gráfico representativo da variação das áreas dos picos dos compostos α -dicarbonílicos em função do tempo de extração. O volume da solução aceitadora 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, foi 0,5 mL.....	22
Figura 9.4 - Cromatogramas sobrepostos obtidos para os ensaios de um dos tipos de pão.....	26
Figura 9.5 - Gráfico representativo da variação ao longo de quatro dias dos compostos α -dicarbonílicos no pão. Os ensaios foram realizados em triplicado e a moagem da amostra era feita antes de cada extração. As extrações foram efetuadas durante 15 min, a 65 °C e o volume da solução aceitadora 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, foi 0,5 mL.....	27
Figura 10.1 - Gráfico representativo da variação das áreas dos picos dos aldeídos em função do tempo de extração. A solução aceitadora escolhida foi DNPH 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, e o seu volume 1,0 mL	28
Figura 10.2 - Gráfico representativo da variação das áreas dos picos dos aldeídos em função da temperatura de extração. O tempo utilizado foi 15 min. A solução aceitadora escolhida foi DNPH 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, e o seu volume 1,0 mL.....	29
Figura 10.3 - Gráfico representativo da variação das áreas dos picos dos aldeídos em função do volume da solução aceitadora. O tempo utilizado foi 15 min. A solução aceitadora escolhida foi DNPH 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, e o seu volume 1,0 mL.....	31

Figura 10.4 - Área do pico do acetaldeído em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.....	32
Figura 10.5 - Área do pico do benzaldeído em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.....	32
Figura 10.6 - Área do pico do decanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.....	32
Figura 10.7 - Área do pico do formaldeído em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.....	32
Figura 10.8 - Área do pico do furfural em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.....	32
Figura 10.9 - Área do pico do hexanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.....	32
Figura 10.10 - Área do pico do nonanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.....	33
Figura 10.11 - Área do pico do octanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.....	33
Figura 10.12 - Área do pico do pentanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.....	33
Figura 10.13 – Cromatogramas sobrepostos obtidos para a quantificação das rolhas com lavagem Alfa com diferentes concentrações de aldeídos. O <i>inlet</i> foca o pico do formaldeído.....	34
Figura 10.13 - Gráfico representativo da composição de 3 tipos de rolha de aglomerado diferentes.....	35

Índice de tabelas

Tabela 3.1 – Algumas propriedades químicas e físicas dos compostos α -dicarbonílicos.	6
Tabela 3.2 – Algumas propriedades químicas e físicas dos aldeídos utilizados neste trabalho.	8
Tabela 6.1 - Instrumentação utilizada para a medição de volumes e de massas.	14
Tabela 6.2 – Material utilizado para o processo de extração.	14
Tabela 6.3 - Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado.	15
Tabela 6.4 - Outro tipo de material utilizado.	15
Tabela 7.1 - Tabela com os reagentes e solventes utilizados ao longo deste trabalho com as respectivas fórmulas moleculares e marca.	16
Tabela 9.1 - Valores obtidos para os ensaios em headspace e mergulhados.	23
Tabela 9.2 - Valores calculados de r^2 , LOD, LOQ e CV.	24
Tabela 9.3 - Concentrações de DC, PN e HX para cinco tipos diferentes de pão.	25
Tabela 10.1 - Concentrações obtidas para cada aldeído numa rolha com tratamento Alfa.	332

Índice de abreviaturas

DC - Diacetilo

PN - 2,3-pentanodiona

HX – 2,3-hexanodiona

GDME – Gas-diffusion Microextraction (Microextração por Difusão Gasosa)

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

OFDA - *o*-fenilenodiamina

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina

COV – Compostos orgânicos voláteis

COSV – Compostos orgânicos semi-voláteis

SPME - Solid Phase Microextraction (Microextração em fase sólida)

QuEChERS - Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe

I – INTRODUÇÃO

1 – O Pão

Os povos pré-históricos começaram a cozer pão há cerca de 10000 anos atrás. Mais tarde, na antiga Mesopotâmia, atual Iraque, as pessoas utilizavam pedras para moer os grãos de trigo, adicionavam água e cozinhavam a mistura. Antes de as pessoas conhecerem o fermento, retiravam um pouco de massa crua antes de a cozerem e acrescentavam à mistura seguinte. Entre os cozimentos, a massa era fermentada por leveduras presentes na atmosfera.

Atribui-se aos antigos egípcios a descoberta do processo de fermentação; começaram a usar esta técnica no ano de 2600 aC. Na Roma antiga, as padarias tornaram-se estabelecimentos conceituados da sociedade e o pão tinha tanto valor que os fornos eram construídos dentro de templos. Em 100 aC, Roma tinha mais de 200 padarias comerciais. Os romanos melhoraram o processo de moagem, e, como resultado, tornaram-se os primeiros a confeccionar o pão branco. Nos séculos seguintes, devido à troca de conhecimentos entre os vários povos, a variedade de tipos de pão aumentou.

A industrialização trouxe novas formas de produzir pão através do fermento de padeiro, um concentrado de leveduras que torna a fermentação mais rápida. Apesar deste desenvolvimento, vários provadores consideram que se perdem várias qualidades com o uso do fermento de padeiro como os sabores e aromas. [1] Os compostos estudados ao longo deste trabalho surgem no pão, amostra estudada, durante o processo de fermentação.

Atualmente, em Portugal, são produzidas diariamente 2700 ton de pão e apesar do seu consumo ter vindo a diminuir com o tempo, cada português consome cerca de 100kg de pão por ano. O pão tem custo reduzido, fácil acesso e disponibilidade e, tradicionalmente, é um alimento sempre presente na dieta mediterrânica.

2 – A Cortiça

A cortiça é um material leve, elástico e praticamente impermeável a líquidos e gases, imputrescível, devido à pouca quantidade em elementos albuminóides e à presença de taninos. A cortiça engloba na sua composição vários tipos de compostos, que tradicionalmente são divididos em cinco grupos, apresentando os seguintes valores típicos: suberina (45%), lenhina (27%), polissacáridos (12%), ceroides (6%) e taninos (6%). Estes grupos são assim denominados face ao conjunto de compostos que incluem e ao seu modo de obtenção/separação. [2]

Devido à sua capacidade em flutuar, os Gregos e os Romanos usaram a cortiça para construir barcos de pesca, redes de pesca e anzóis. Era também usada tanto em solas dos sapatos como em sapatos inteiros, especialmente no inverno, visto que é um excelente isolador térmico. Relativamente ao uso da cortiça como rolhas, há registos de rolhas de cortiça em ânforas gregas datadas do século V aC que foram encontradas no mar Mediterrâneo. Esta foi a primeira descoberta do uso deste material para este fim apesar de se acreditar que o seu uso possa ter começado antes.

Os Romanos continuaram a usar a cortiça como rolha, mas só a partir do século XV, com o aparecimento das garrafas de vidro, é que as rolhas de cortiça passaram a ter grande aplicação.

Em meados do século XVIII, começou a industrialização deste material, com uma fábrica em Llacostera, Espanha. As rolhas eram feitas manualmente e cada funcionário produzia cerca de 2000 a 2500 por dia.

A cortiça é um material com aplicações conhecidas desde a antiguidade, sobretudo como artefacto flutuante e como vedante, cujo mercado teve uma enorme expansão a partir do início do século XX, face ao desenvolvimento dos diversos tipos de aglomerados.

No final da década de 70 do século XX, existiam cerca de 500 produtores de rolhas em Portugal que empregavam cerca de 50000 pessoas. Tendo em conta que a população ativa portuguesa na altura era de cerca de 3 milhões de habitantes, a indústria corticeira tornou-se bastante importante para o país. Atualmente, esta indústria, representa cerca de 3% do PIB português. Aproximadamente metade da produção mundial de cortiça e cerca de 85% de todas as rolhas produzidas no mundo são feitas em Portugal. [3, 4]

O processo de fabrico de uma rolha de cortiça é longo e envolve um conjunto de etapas que se encontram esquematizadas na Figura 2.1. O processo de fabrico de rolhas de cortiça começa com a retirada da cortiça que reveste os sobreiros. De seguida, as pranchas de cortiça são expostas ao meio ambiente durante um período de vários meses. Após este primeiro passo as pranchas são cozidas em água durante cerca de 1-2h. Posteriormente o material sofre um processo de autoclavagem. Este passo realiza-se sob condições de elevada pressão e temperatura e tem como objetivo eliminar os microrganismos existentes. Após a secagem processa-se à brocagem, obtendo-se pedaços de cortiça com a forma típica da rolha. Após esta etapa são aplicados diferentes tratamentos químicos às rolhas com o objetivo de alterar as características visuais das rolhas. A marcação final tanto pode ser a tinta como a fogo, com a marca ou o logótipo do comprador. No início do trabalho compraram-se várias amostras na “Casa das Rolhas” no Porto, e realizaram-se ensaios preliminares de forma a confirmar a presença de aldeídos nas amostras. Após se ter sucesso nestes testes, estabeleceu-se contato com uma empresa de transformação de cortiça para se arranjar amostras de rolhas de cortiça do mesmo lote e de diferentes fases de tratamento das rolhas.

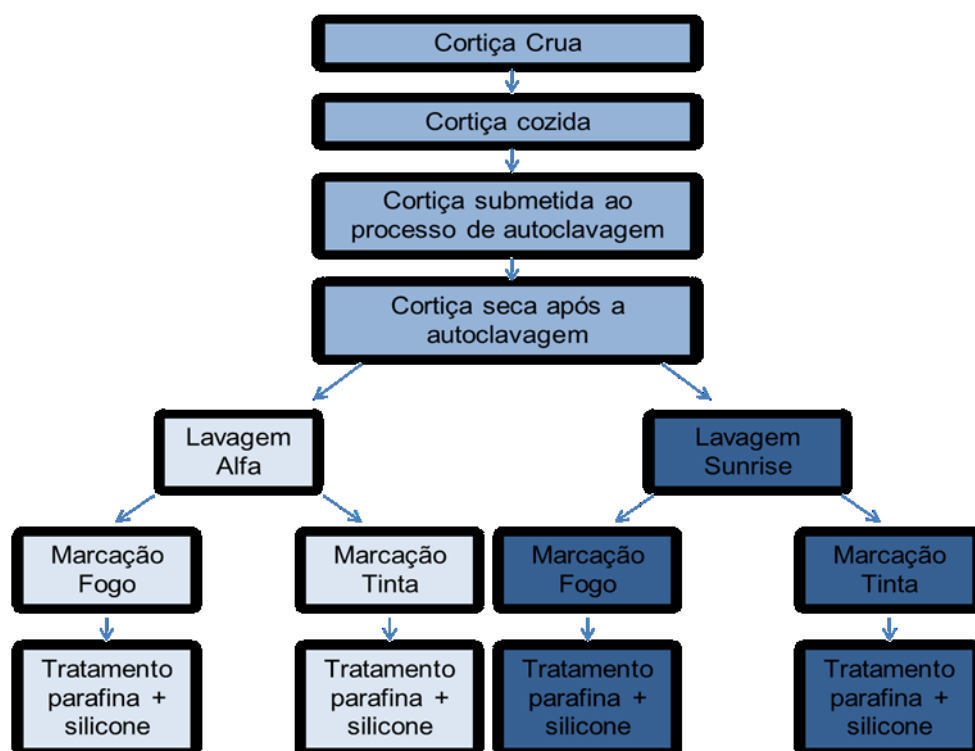


Figura 2.1 - Representação esquemática do processo de fabrico de rolhas de cortiça.

3 - Compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis

Os compostos orgânicos voláteis (COV) e os compostos orgânicos semi-voláteis (COSV) são geralmente associados ao sabor e ao aroma dos alimentos e são fatores importantes para avaliar a aceitação ou rejeição de produtos alimentares por parte do consumidor. Muitos dos COV e COSV possuem propriedades aromáticas, antifúngicas, inseticidas, terapêuticas e sinalização biológica. Torna-se, portanto, importante investigar os COV e os COSV para avaliar a qualidade dos produtos, a autenticidade, a pureza e a origem. As propriedades físico-químicas de compostos orgânicos voláteis podem sofrer alterações com o tempo. Assim, compostos orgânicos voláteis são facilmente oxidados O_2 atmosférico ar e/ou degradados pelo calor. Deste modo, as técnicas utilizadas têm de ser sensíveis a estes aspetos. [5]

3.1 – Compostos α -dicarbonílicos

O grupo carbonilo (C=O) é um grupo funcional bastante importante em química biológica visto que é o grupo funcional que caracteriza aldeídos e cetonas, e se encontra presente nos ácidos carboxílicos, ésteres e amidas. Aldeídos e cetonas são também referidos como compostos carbonílicos ou carbonílicos. Os compostos α -dicarbonílicos são conhecidos principalmente por acrescentarem características sensoriais aos alimentos resultantes da atividade de microorganismos presentes em alimentos fermentados, como o vinho, o brandy, o iogurte, o vinagre ou a manteiga. [6] O diacetilo (DC) ou 2,3-butanodiona é um desses compostos e a sua determinação na área alimentar é importante devido às suas características organoléticas. [7] O DC é conhecido por ser o composto responsável pelo aroma e sabor amanteigado em vários alimentos. Os compostos α -dicarbonílicos referidos são produtos de diversas reações enzimáticas e químicas que ocorrem nos alimentos, especialmente a reação de Maillard, para além de serem importantes em diversos processos biológicos. [8, 9] Na Figura 3.1 encontra-se um esquema do processo de formação do DC. [10] Na Tabela 3.1 são apresentadas algumas propriedades químicas e físicas dos compostos α -dicarbonílicos.

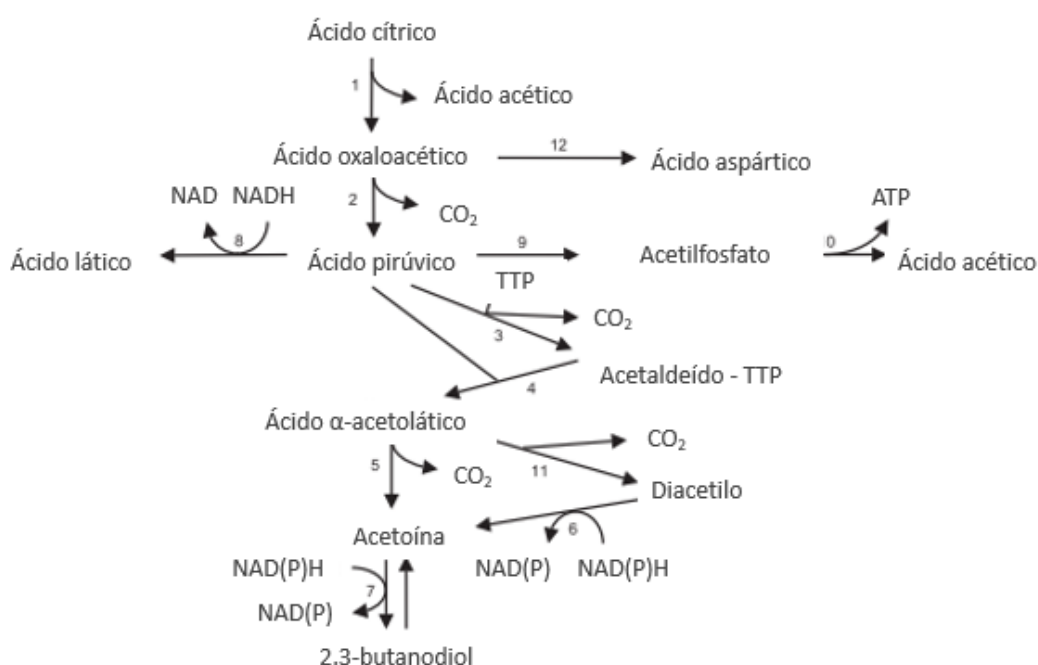
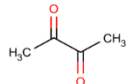
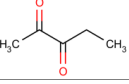
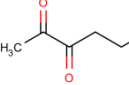


Figura 3.1 - Representação esquemática do processo de formação do diacetilo.

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

O limite sensorial do diacetilo é relativamente baixo: nos vinhos varia entre 0,1 e 5 mg/L, dependendo, entre outros fatores, do tipo de vinho. Este composto pode ser encontrado em todos os tipos de vinhos, principalmente após a fermentação malolática, um processo fermentativo que ocorre após ou simultaneamente com a fermentação alcoólica. A fermentação malolática envolve a descarboxilação do ácido L-málico para o ácido L-láctico, diminuindo a acidez do vinho e alterando o seu aroma. [11]

Tabela 3.1 – Algumas propriedades químicas e físicas dos compostos α -dicarbonílicos.

Composto estudado	Temperatura de fusão (K)	Temperatura de ebulição (K)	Massa molar (g/mol)	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Diacetilo	270,15	360,15	86,09	C ₄ H ₆ O ₂	
2,3-pentanodiona	221,15	383,15	100,12	C ₅ H ₈ O ₂	
2,3-hexanodiona	243,15	403,15	114,15	C ₆ H ₁₀ O ₂	

Relativamente ao pão, o DC também é associado a um emulsionador denominado DATEM (*diacetyl tartaric acid esters of monoglycerides*). Utiliza-se este emulsionador para melhorar a qualidade do pão. Quando adicionado à massa do pão aumenta a tolerância à mistura, a retenção gasosa e a resistência ao colapso da massa. No produto final, esta substância, aumenta o volume do pão, melhora a sua textura e torna mais fácil fatiar o produto. [12-14]

Sobre os efeitos provocados na saúde humana devido à exposição a este composto, o *Center for Disease Control and Prevention* definiu que o limite de exposição recomendável para o DC é 5 ppb, durante 8h. Para exposição de curto prazo o limite é 25 ppb durante 15 min. Se estes limites não forem respeitados, os efeitos na saúde humana podem ser obstrução pulmonar grave e conseqüente diminuição da capacidade de funcionamento pulmonar e bronquiolite obliterante. Os funcionários dos cinemas são um exemplo de profissionais que podem estar sujeito a este tipo de exposição. O óleo para fritar as pipocas aquece bastante provocando a libertação do diacetilo.

3.2 – Aldeídos




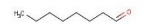



Os aldeídos são um grupo de compostos orgânicos representado pela fórmula molecular geral RCHO, onde R pode ser um hidrogénio ou um grupo alifático, aromático ou heterocíclico. Devido à sua elevada reatividade, os aldeídos alifáticos são muitas vezes utilizados em sínteses orgânicas. [15] O odor dos aldeídos que têm baixo peso molecular é incomodativo, porém, à medida que o número de carbonos aumenta, torna-se mais agradável. Os aldeídos de maior peso molecular, que possuem de 8 a 12 átomos de carbono, são muito utilizados na indústria cosmética na produção de perfumes sintéticos.

Os aldeídos têm sido bastante estudados visto que podem provocar danos na saúde dos seres vivos. Por exemplo, o formaldeído e a acroleína são conhecidos por causarem irritações nos animais e no ser humano, e o formaldeído é um agente carcinogénico. Estes compostos quando reagem com o ozono formam compostos orgânicos poluentes presentes no *smog* fotoquímico. A maioria destes compostos presentes na poluição atmosférica provém diretamente da combustão de combustíveis fósseis. [16]

O furfural, um dos compostos estudados neste trabalho, é um aldeído heterocíclico com a fórmula química $C_5H_4O_2$. É um líquido oleoso sem cor e com aroma a amêndoa, mas quando exposto ao ar torna-se amarelo. É um dos compostos encontrados na baunilha. [17] Na Tabela 3.2 são representadas algumas propriedades químicas e físicas de alguns aldeídos utilizados neste trabalho.

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 3.2 – Algumas propriedades químicas e físicas dos aldeídos utilizados neste trabalho.

Composto estudado	Temperatura de fusão (K)	Temperatura de ebulição (K)	Massa molar (g/mol)	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Furfural	236,15	435,15	96,08	C ₅ H ₄ O ₂	
Benzaldeído	247,15	451,25	106,13	C ₇ H ₆ O	
Hexanal	<253,15	392,15-397,15	100,16	C ₆ H ₁₂ O	
Octanal	285-288	444,00	128,21	C ₈ H ₁₆ O	
Nonanal	255,15	464,15	142,24	C ₉ H ₁₈ O	
Decenal	369,26	352,15	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O	
Decanal	280,15	493,15	156,20	C ₁₀ H ₂₀ O	

4 – Microextração por difusão gasosa (GDME)

Nas últimas décadas, as técnicas de extração sofreram um desenvolvimento considerável e os instrumentos analíticos são agora muito mais sofisticados, automatizados e multifuncionais. Apesar de todos estes progressos, as amostras são muitas vezes demasiado complexas para determinações diretas. Existe assim a necessidade de se desenvolverem novos métodos de preparação de amostra que sejam simultaneamente simples, rápidos, baratos e que provoquem a mínima alteração na amostra. O processo de preparação da amostra é frequentemente visto como o passo limitante em muitos procedimentos analíticos, visto que pode envolver um consumo elevado tanto de reagentes como de tempo. Também tem um papel importante na precisão e na exatidão global das metodologias. A preparação de amostras inclui muitas vezes uma extração que resulta no isolamento dos analitos desejados da matriz. Se for conveniente, a derivatização pode ser usada de forma a facilitar a separação e/ou deteção dos diferentes compostos. Apesar das técnicas clássicas de preparação, como a extração por Soxhlet, a extração líquido-líquido ou a extração em fase sólida, serem

ainda as mais usadas na prática, têm havido desenvolvimentos notáveis neste campo. Uma inovação interessante no campo das extrações para fins analíticos é a das técnicas baseadas em membranas. Na indústria, o uso de membranas já é antigo e são usadas em bastantes processos industriais. Apesar disto, a utilização de membranas em aplicações analíticas é mais recente e é normalmente associado a sistemas de análises em fluxo. [18]

4.1 – Funcionamento e princípios do processo de extração

A microextração por difusão gasosa (Gas-diffusion microextraction, GDME) é uma técnica que foi desenvolvida recentemente e que combina as vantagens da difusão gasosa e da microextração. Difusão gasosa é o nome dado a um sistema no qual a separação dos analitos é baseado na transferência de massa por difusão do analito, sob a forma de vapor, através da camada gasosa que separa as duas fases. Por definição, microextração é uma técnica de extração em que o volume da fase que se extraiu é bastante menor comparativamente com o volume da amostra; normalmente a extração não é exaustiva. Este aspeto é bastante útil para, por exemplo, acompanhar a variação da concentração de um certo composto ao longo do tempo sem se alterar de forma considerável a matriz em estudo. [18]

Os componentes principais do sistema de extração utilizado (GMDE) são: um gobelé de paredes duplas, um banho termostaticado e um módulo extrator. O módulo extrator é em Teflon, de dimensão reduzida e tem no seu interior uma pequena membrana microporosa hidrofóbica. A membrana impede a difusão do solvente mas permite a transferência de massa de analitos voláteis e semi-voláteis. A membrana de 10 mm de diâmetro usada no módulo foi obtida a partir de um instrumento de corte artesanal. Na Figura 4.1 encontra-se representado um esquema da extração recorrendo à GDME. [18]

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

O módulo é colocado num gobelé que, por sua vez, está ligado a um banho com controlo de temperatura. Uma determinada quantidade de amostra é colocada dentro do gobelé seguindo-se a introdução do reagente derivatizante no interior do módulo. Após a extração ter decorrido durante um período de tempo, recolhe-se a solução obtida. Na maioria das vezes esta solução está pronta para ser diretamente injetada num aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/UV). [18] Uma das principais alterações do método de extração entre amostras líquidas e sólidas prende-se com a colocação do módulo que no caso das amostras líquidas pode ser mergulhado ou em headspace mas nas amostras sólidas só pode ser em headspace.

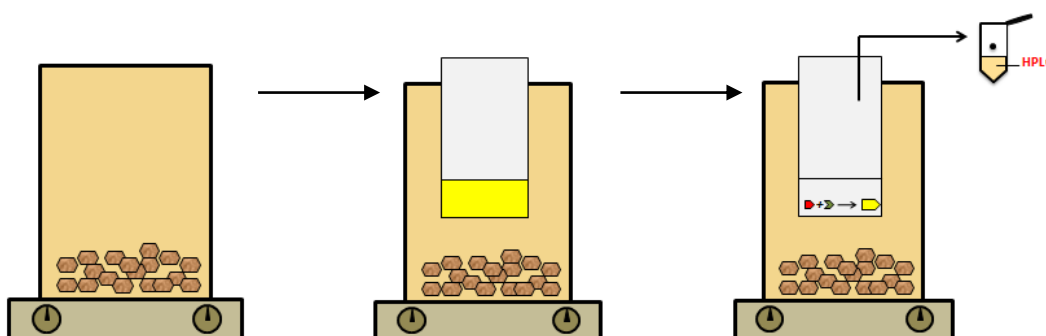


Figura 4.1 - Representação esquemática do processo de extração para amostras sólidas usado na GDME.

4.2 – Reação de derivatização

A derivatização envolve uma reação química que altera o analito de modo a promover ou melhorar a sua separação e deteção. [2] A GDME torna-se mais útil se utilizado simultaneamente com uma reação de derivatização visto que aumenta a possibilidade de recolha do analito, facilita a separação, a deteção e a identificação do composto. Para além disso aumenta a eficiência do processo de extração uma vez que promove um efeito de deslocamento do equilíbrio de partição dos compostos entre as fases. Neste trabalho utilizaram-se a *o*-fenilenodiamina e a 2,4-dinitrofenilhidrazina como reagentes derivatizantes. [19, 20]

4.2.1 – Reação de derivatização de compostos α -dicarbonílicos com o-fenilenodiamina (OFDA)

Para se detetar os compostos α -dicarbonílicos com recurso ao HPLC/UV é necessário primeiro fazê-los reagir com a OFDA. Quando este passo acontece, os compostos, neste caso, o DC, a PN e a HX, convertem-se em quinoxalinas e deste modo são detetados por espectrofotometria de UV. Na Figura 4.2 encontra-se a equação que representa reação de derivatização entre os compostos α -dicarbonílicos e a OFDA. [18, 21, 22]

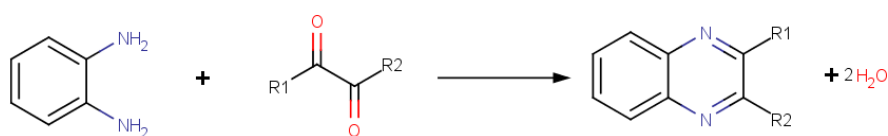


Figura 4.2 – Equação que representa a reação de derivatização entre a OFDA e os compostos α -dicarbonílicos dando origem a quinoxalinas.

4.2.2 – Reação de derivatização dos aldeídos com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)

A determinação de aldeídos é importante visto que estes estão presentes em muitos alimentos e materiais com os quais temos contato diariamente. A sua análise usando o HPLC/UV é difícil devido, muitas vezes, à falta de cromóforos. Com recurso à derivatização consegue-se ultrapassar estes problemas. [23] O DNPH é um dos reagentes de derivatização mais comuns. É usado em estudos que envolvem aldeídos e cetonas visto que reage com o grupo carbonilo destes devido à presença do grupo amino no reagente. Em condições ácidas formam 2,4-dinitrofenilhidrazonas. As derivações resultantes aumentam consideravelmente a absorção por UV e a retenção hidrofóbica facilitando a deteção e separação no HPLC.

É, portanto, aconselhado o uso deste derivatizante visto simultaneamente consegue-se analisar diferentes aldeídos. Na Figura 4.3 encontra-se representada a equação da reação de derivatização entre o DNPH e os compostos dicarbonílicos. [19, 27, 28]

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

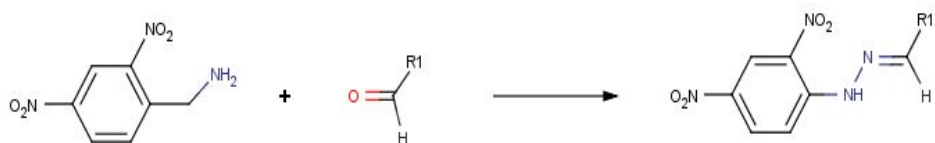


Figura 4.3 – Equação que representa a reação de derivatização entre DNPH e compostos dicarbonilos.

5 – Amostras líquidas estudadas recentemente com recurso à GDME e técnicas utilizadas em amostras sólidas

5.1 - Amostras líquidas

As primeiras amostras que foram estudadas pela GDME foram amostras líquidas, mais precisamente bebidas alcoólicas como vinhos e cervejas.

Esta técnica inovadora surgiu em Outubro de 2010. Nesse trabalho apresentavam-se os fundamentos da microextração por difusão gasosa e faziam a sua aplicação amostras alcoólicas, sendo o objetivo detetar α -dicetonas vicinais. [18]

Nos anos seguintes foram publicados outros trabalhos com diferentes amostras e compostos. Os compostos em foco foram aldeídos como o acetaldeído, o metilpropanal e o furfural que foram extraídos da cerveja com recurso ao derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Mostrou-se que a metodologia proporcionava boa repetibilidade e linearidade assim como bons limites de deteção e quantificação. A extração foi realizada em poucos minutos e a baixo custo. [24]

Outro dos trabalhos realizados prendeu-se com a determinação do diacetilo e da 2,3-pentanediona em cervejas, utilizando como derivatizante o-fenilenodiamina (OFDA). [11]

5.2 – Amostras sólidas

Um dos passos mais importantes em qualquer área da química e um dos mais limitantes é a preparação de amostras. Os químicos analíticos procuram encontrar estratégias que lhes permita obter resultados mais rapidamente, mais eficientes e mais simples. Existem diferentes técnicas de preparação de amostras clássicas e modernas. Nas clássicas

temos a extração por Soxhlet e a extração líquido-líquido por exemplo, enquanto que nas modernas a microextração em fase sólida (SPME) e o QuEChERS (Quick Easy Cheap Rugged Effective and Safe)

O extrator por Soxhlet é um aparelho de laboratório feito de vidro, inventado em 1879 por Franz von Soxhlet. Este equipamento utiliza refluxo de solvente de modo intermitente. A amostra apesar de não ficar em contato com o solvente que se encontra a uma temperatura elevada, consome muito solvente, pois o volume total deve ser suficiente para atingir o sifão (dispositivo utilizado para transportar um líquido de uma altura para outra mais baixa, passando por um ponto mais alto). O método por Soxhlet é um processo de extração que funciona de forma contínua, e é bastante útil nos casos em que o composto puro é parcialmente solúvel num solvente e as impurezas não. [25]

A eficiência deste método depende da natureza do material a ser extraído: polaridade do solvente, ligação dos lípidos com outros componentes, circulação do solvente através da amostra, tamanho das partículas, humidade da amostra, velocidade de refluxo e quantidade relativa de solvente, entre outros. [25]

A SPME é um procedimento que é usado associado à cromatografia gasosa, porque não utiliza solvente. Tem alto poder de concentração; é aplicável a muitos tipos de analitos e é fácil o transporte do material extraído para o cromatógrafo gasoso. A teoria da SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas. Consiste numa fibra ótica de sílica fundida, coberta com um filme fino de um polímero sorvente, fixado num tubo. O procedimento do SPME divide-se em duas etapas: estabelecer os perfis de extração dos analitos e otimizar a transferência do material extraído para a coluna cromatográfica. A SPME tem aplicações em áreas como análise ambiental e de solos, água, alimentos, produtos naturais e farmacêuticos, análise clínica e forense. [26]

A GDME combina as características da difusão gasosa com as vantagens da microextração apresentando resultados eficientes num curto período de espera.

II - MATERIAL E MÉTODOS

6 – Equipamentos e material utilizado

Foram utilizados diferentes tipos de instrumentação consoante a tarefa que se pretendia realizar. O material utilizado foi dividido por tarefas para facilitar a consulta e compreensão em cada parte do trabalho. Nas Tabelas 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 estão elencados os materiais e respetiva marca utilizados ao longo deste estudo.

Tabela 6.1 - Instrumentação utilizada para a medição de volumes e de massas.

Instrumentação	Marca
Balança de precisão	Mettler, modelo AE50
Balança analítica	Mettler, modelo PE200
Micropipetas	Gilson Pipetman

Tabela 6.2 – Material utilizado para o processo de extração.

Instrumentação	Marca
Módulo extrator de Teflon	---
Membranas microporosas	Millipore Mitex™ 5.0µm LS
Banho termostaticado	Medingen E5
Placa de agitação	Metrohm, modelo 649
Gobelé termostaticado com paredes duplas	

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 6.3 - Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado.

Sistema de cromatografia	Marca
Detetor UV/Vis	Jasco UV/Vis-2070 Plus
Bomba	Jasco PU-2089 Plus Quaternary Gradient Pump
Injetor	AS-2055 Plus Intelligent Sampler
Coluna	Phenomenex Gemini C18 (250x4.60mm) 5µm

Tabela 6.4 - Outro tipo de material utilizado.

Instrumentação	Marca
Sistema de purificação da água	Milipore Simplicity
Medidor de pH com eléctrodo de vidro combinado	Metrohm 605 pH-meter
Membranas microporosas	Supelco 0.45 um x 47 nm

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

7 – Reagentes utilizados e preparação de soluções

Ao longo deste trabalho foram utilizadas várias soluções. Os reagentes e solventes usados encontram-se na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 - Reagentes e solventes utilizados ao longo deste trabalho com as respetivas fórmulas moleculares e marca.

Reagente	Fórmula molecular	Marca
Acetato de sódio	CH ₃ COONa	Merck
Ácido acético	CH ₃ COOH	PROLABO
Diacetilo	C ₄ H ₆ O ₂	Sigma-Aldrich
Pentanodiona	C ₅ H ₈ O ₂	Sigma-Aldrich
Hexanodiona	C ₆ H ₁₀ O ₂	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico	HCl	Panreac
Acetonitrilo	CH ₃ CN	Fisher Chemical
OFDA	C ₆ H ₈ N ₂	Sigma-Aldrich
Hidrogenofosfato de Sódio	Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	Sigma-Aldrich
Benzaldeído	C ₇ H ₆ O	Sigma-Aldrich
Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	Sigma-Aldrich
Octanal	C ₈ H ₁₆ O	Sigma-Aldrich
Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	Sigma-Aldrich
Decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	Sigma-Aldrich
Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	Sigma-Aldrich

7.1 – Preparação de soluções para o trabalho da quantificação de compostos α -dicarbonílicos no pão

Utilizou-se 0,80 g de acetato de sódio para a preparação de 1,0 L de tampão acetato. Adicionou-se 0,5 L de água milipore e 0,60 mL de ácido acético glacial ao gobelé colocando a solução no balão volumétrico. Completou-se o volume do balão volumétrico com água milipore.

A solução aceitadora utilizada na GDME era a OFDA. Esta tem tendência para se degradar quando em contacto com a luz solar. Foi necessário preparar-se uma solução 0,1% todos os dias e protegê-la num local abrigado da luz. Para a sua preparação pesaram-se 0,0100 g de OFDA num gobelé e colocaram-se num balão volumétrico de 10,00 mL. Utilizou-se tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7 para completar o volume.

Para a preparação do tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7 utilizaram-se 35,8 g de hidrogenofosfato de sódio para 1 L de solução. O ajuste do pH era feito através da adição de HCl 1M e com controlo através de um eletrodo de pH e com um milivoltímetro.

Prepararam-se soluções mães de DC, PN e HX, com concentração 1000 ppm que foram armazenadas em frigorífico (4 °C). Diariamente as soluções iniciais foram diluídas de modo a obter-se concentrações inferiores. Essas soluções eram preparadas em balões volumétricos com 10,00 mL e com concentração de 15 ppm.

7.2 – Condições cromatográficas utilizadas para o trabalho da quantificação de compostos α -dicarbonílicos no pão

As separações dos compostos α -dicarbonílicos derivatizados (quinoxalinas) eram conseguidas com recurso a uma coluna Phenomenex Gemini C18 (250 x 4,60 mm, 5 μ m) em condições isocráticas 50% de acetonitrilo e 50% de tampão acetato (0,01 mol L⁻¹, pH 4) durante 15 min. O fluxo utilizado era de 0,8 mL/min e a deteção das quinoxalinas foi efetuada a um comprimento de onda de 315 nm.

7.3 – Preparação de soluções para o trabalho das rolhas de cortiça

A solução de DNPH obteve-se uma solução misturando 100 mL de acetonitrilo com 100 mL de uma solução HCl 0,04 mol/L. Posteriormente na solução dissolveram-se 0,5 g de DNPH. A mistura obtida foi homogeneizada.

Tal como ocorreu no trabalho anterior prepararam-se inicialmente soluções dos compostos utilizados com concentração 1000 ppm que foram mantidas no frigorífico (4°C). Sempre que houve necessidade diluíram-se as soluções previamente preparadas. A maioria das soluções dos aldeídos tinha concentração 50 ppm. A solução utilizada na preparação dessas soluções foi o tampão acetato de sódio 0,01 mol/L pH 4.

7.4 – Condições cromatográficas utilizadas para o trabalho da evolução dos aldeídos em rolhas de cortiça

As separações foram efetuadas recorrendo a uma coluna Phenomenex Gemini C18 (250 x 4,60 mm, 5 µm) em modo gradiente nas seguintes condições: 0 min 50% A; 25 min 100% A; 30 min 50% A; 40 min 50% A, sendo o A acetonitrilo e o B tampão acetato (0,01 mol L⁻¹, pH 4), durante 15 min. O fluxo utilizado foi de 0,8m L/min e a deteção dos derivados dos aldeídos foi efetuada a um comprimento de onda de 360 nm.

8 – Procedimentos de extração

8.1 – Procedimento geral de extração para o pão

O pão utilizado era comprado diariamente em padarias e triturado antes de cada ensaio. Após um processo de otimização verificou-se que as melhores condições para a realização dos ensaios seria com uma temperatura de extração de 65 °C, durante 15 min, utilizando como solução aceitadora 500 µL OFDA. Em cada ensaio foram utilizadas 5 g de amostra.

8.2 - Procedimento geral de extração dos vários aldeídos da cortiça

Durante o processo de extração, e após a otimização do mesmo, as condições foram as seguintes: a temperatura escolhida foi 50 °C, o tempo de extração 15 min, a solução aceitadora utilizada era o DNPH sendo o seu volume 1 mL. A trituração da rolha era efetuada sempre antes de cada ensaio e da sua tritura era utilizada 1 g.

III – Resultados

A – Estudo dos compostos α -dicarbonílicos no pão

9 – Estudo e otimização dos parâmetros que influenciam o processo de extração do pão

Primeiramente, foram estudados diferentes parâmetros que podem afetar a extração dos compostos voláteis, entre os quais: a temperatura, a agitação, o tempo de extração, o volume da solução aceitadora, entre outros. A influência da concentração do derivatizante foi um dos aspetos principais levados em consideração. Para este estudo foram testadas quatro concentrações (m/v) diferentes: 0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,3%. Este teste foi o primeiro a ser realizado visto que era necessário saber se os compostos α -dicarbonílicos presentes nas amostras eram todos derivatizados pela solução aceitadora. A concentração 0,05% não foi suficiente mas as outras três provaram ser. Como tal optou-se por uma concentração de OFDA de 0,1%.

9.1 – Estudo da temperatura de extração

Uma das otimizações realizadas foi o estudo do efeito da variação da temperatura de extração. Testaram-se as temperaturas de 25, 35, 45, 55, 65 e 75 °C. Em todos os ensaios o tempo de extração foi de 15 min e o volume de solução aceitadora foi 500 µL.

Com o aumento da temperatura, verificou-se um aumento da volatilização dos compostos presentes na amostra levando a uma maior passagem dos compostos para a solução aceitadora. Obtiveram-se, portanto, picos maiores para temperaturas superiores, neste caso 75 °C. Apesar deste fato ter ocorrido, era perigoso e difícil realizar os ensaios a esta temperatura devido a riscos de queimaduras e ao facto de a solução extratora poder evaporar. Na Figura 9.1 encontram-se os resultados obtidos para o efeito da temperatura de extração.

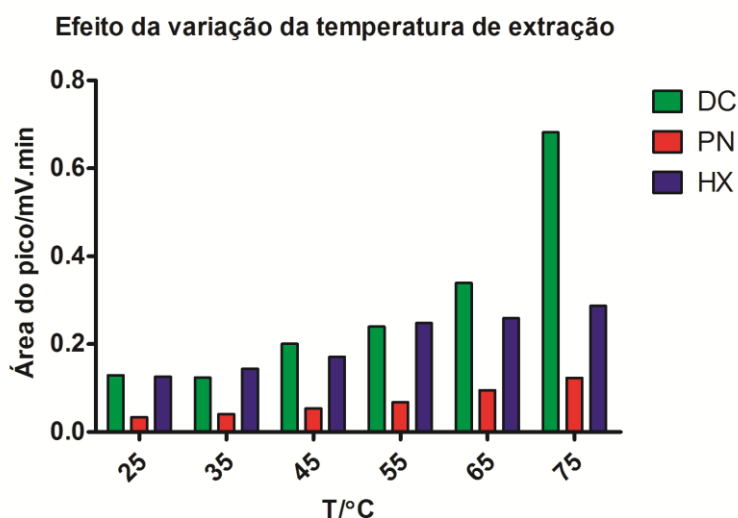


Figura 9.1 - Gráfico representativo da variação das áreas dos picos dos compostos α -dicarbonílicos em função da temperatura de extração. O tempo utilizado 15 min. O volume da solução aceitadora 0,1 %, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, foi 0,5 mL.

Tendo em conta que existe evaporação da solução extratora, estabeleceu-se que temperatura mais indicada para a realização deste estudo seria 65 °C visto que combina uma boa recolha dos compostos com boa sensibilidade.

9.2 – Efeito da variação de volume da solução aceitadora

Um dos parâmetros principais a ser estudado foi o efeito da variação de volume da solução aceitadora, OFDA. Foram estudados 5 volumes diferentes (0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,7 mL), durante 15 min cada, a 65 °C. Como era de esperar, quanto menor o volume, maior a área do pico, devido ao efeito da concentração. O gráfico representativo do efeito da variação do volume da solução aceitadora encontra-se na Figura 9.2.

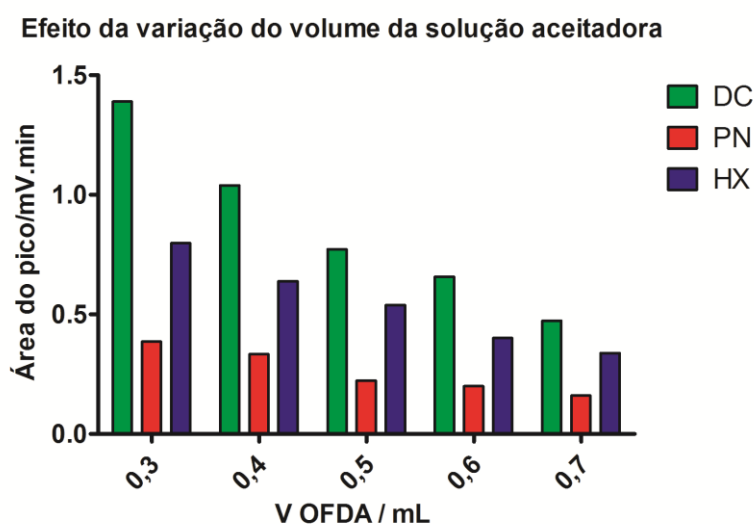


Figura 9.2 - Gráfico representativo da variação das áreas dos picos dos compostos α -dicarbonílicos em função do volume da solução aceitadora. O tempo utilizado foi 15 min. O volume da solução aceitadora 0,1 %, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, foi 0,5 mL.

Tendo em conta a necessidade de recobrir completamente a membrana com a solução aceitadora, estabeleceu-se o volume de 0,5 mL visto que combinava uma quantidade suficiente para recobrir sem dificuldade a membrana e permitiu obter uma área do pico satisfatória.

9.3 – Efeito do tempo de extração

Foram feitos ensaios para perceber a influência do tempo no processo de extração. Este parâmetro era relevante para o decorrer do trabalho visto que quanto menor o tempo de cada ensaio, mais ensaios se conseguiria realizar num dia, otimizando o tempo necessário para a análise.

Os tempos de extração estudados foram 5, 10, 15, 30, 40, 50, 60, 75 e 90 min. Os ensaios foram realizados a temperatura constante de 65 °C e com 0.5mL de solução aceitadora. O gráfico representativo do efeito do tempo de extração encontra-se na Figura 9.3.

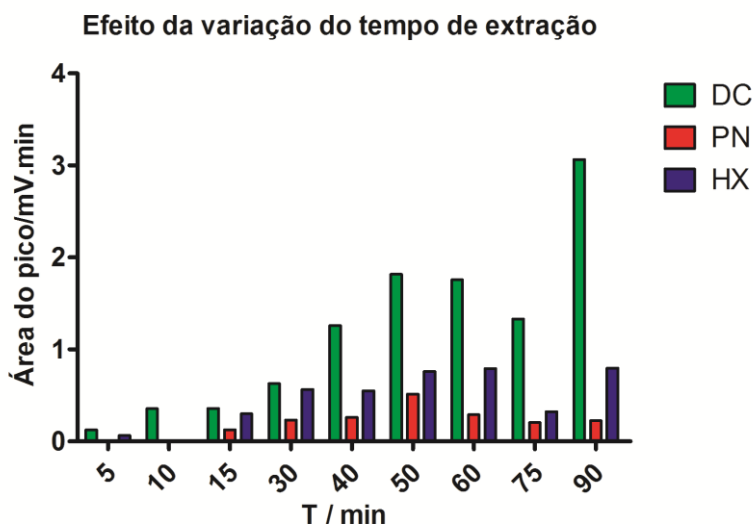


Figura 9.3 - Gráfico representativo da variação das áreas dos picos dos compostos α -dicarbonílicos em função do tempo de extração. O volume da solução aceitadora 0,1 %, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, foi 0,5 mL.

Em teoria, para maiores tempos de extração, maior quantidade de compostos voláteis é extraída da amostra. Apesar de os melhores resultados terem sido para tempos de espera elevados, estes resultados não foram considerados tendo em conta que ocorria a evaporação da solução aceitadora ao longo do tempo e não era possível esperar-se tanto tempo por um ensaio apenas. Ponderando estes fatores, o tempo escolhido foi 15 min.

9.4 – Diferença entre o módulo mergulhado e o módulo em *headspace*

A diferença entre colocar o módulo mergulhado e em *headspace* era um aspeto a estudar visto que até ao início deste trabalho os únicos ensaios realizados tinham sido com o módulo mergulhado. Utilizaram-se 2,0 g de pão triturado em 20,0 mL de água para o ensaio com o módulo mergulhado e 5,0 g para o ensaio em *headspace*. As concentrações das soluções padrão dos compostos α -dicarbonílicos adicionados para o método de adição padrão foram 15 ppm para o DC e 25 ppm para a PN e a HX. Os melhores sinais foram obtidos com o módulo em *headspace* para qualquer um dos compostos. No caso do módulo mergulhado, foi quantificado o DC que passou para a água e a partir daí determinou-se a quantidade que existia na amostra; em *headspace* determinou-se diretamente a concentração na amostra. Existe maior incerteza no caso das PN e da HX. Na Tabela 9.1 podem ser encontrados os sinais relativos a este parâmetro. Os valores de concentração calculados para os dois casos foram os seguintes: 114 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 109 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabela 9.1 - Valores obtidos para os ensaios em *headspace* e mergulhados.

MÓDULO MERGULHADO							
		DC		PN		HX	
Volume/ mL	m / g	Área do pico	m / g	Área do pico	m / g	Área do pico	
0	0	0,004	0	0,001	0	0,004	
0,05	0,00075	0,022	0,00125	0,011	0,00125	0,032	
0,1	0,00150	0,032	0,00250	0,025	0,00250	0,045	
0,15	0,00225	0,051	0,00375	0,038	0,00375	0,076	
MÓDULO HEADSPACE							
		DC		PN		HX	
Volume/ mL	m / g	Área do pico	m / g	Área do pico	m / g	Área do pico	
0	0	0,025	0	0,022	0	0,008	
0,05	0,00075	0,476	0,00125	0,234	0,00125	0,444	
0,1	0,00150	0,866	0,00250	0,481	0,00250	1,037	
0,15	0,00225	0,995	0,00375	0,545	0,00375	1,191	

9.5 – Influência do efeito da agitação

Foi estudado o efeito da agitação durante o processo de extração. Estes testes foram feitos com 3 quantidades diferentes de volume de solução aceitadora e com ou sem agitação. Em qualquer uma das situações a agitação não influenciou consideravelmente o resultado final devido ao facto de a amostra estar no estado sólido. O objetivo da agitação era facilitar a volatilização dos compostos acelerando a reação com a solução aceitadora. Se estivesse no estado líquido este parâmetro seria mais relevante visto que a agitação seria mais uniforme e acelerava a volatilização dos compostos. Optou-se por não se utilizar a agitação nos ensaios futuros.

9.6 - Validação da metodologia

A validação da metodologia proposta foi confirmada por meio de curvas de calibração ajustadas em função da matriz: as extrações foram realizadas em pequenas quantidades de pão “velho”, colocados dentro do módulo de extração, com 40 µL da solução adequada de DC, PN e HX. Os resultados em termos de linearidade ($n \geq 5$), limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), e coeficiente de variação (CV) estão resumidos na Tabela 9.2. O LOD e o LOQ foram calculados multiplicando por 3 e 10, respetivamente, o desvio padrão da interceção/inclinação, para uma massa padrão de 5 g. O CV da metodologia foi avaliado através da análise de cinco ensaios de uma amostra ($n = 5$) realizados no mesmo dia.

Tabela 9.2 - Valores calculados de r^2 , LOD, LOQ e CV.

Composto α-dicarbonílico	r^2	LOD / $\mu\text{g kg}^{-1}$	LOQ / $\mu\text{g kg}^{-1}$	CV / % ¹
DC	0.996	6.0	20	4.6
PN	0.991	8.6	29	6.4
HX	0.992	12	38	4.9

¹ Desvio-padrão expresso em % valor médio ($n=5$)

De modo a se ter confiança nos resultados experimentais foi necessário repetir os ensaios para confirmar a sua repetibilidade. Neste caso, executaram-se 4 ensaios com a mesma amostra, nas mesmas condições e os resultados foram satisfatórios. Ao

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

ajustar os dados experimentais por meio de regressão linear, os valores obtidos de r^2 foram todos acima de 0,99.

9.7 - Aplicabilidade em amostras reais

Como foi referido anteriormente, esta técnica foi aplicada em diferentes tipos de pão de modo a comprovar a sua utilidade na determinação de compostos voláteis em amostras sólidas. Na Tabela 9.3 encontram-se as concentrações obtidas para cinco tipos diferentes de pão.

Tabela 9.3 - Concentrações de DC, PN e HX para cinco tipos diferentes de pão.

Amostra	[DC] / $\mu\text{g Kg}^{-1}$	[PN] / $\mu\text{g Kg}^{-1}$	[HX] / $\mu\text{g Kg}^{-1}$
Pão com frutos secos	99 ± 12	88 ± 29	83 ± 21
Pão branco	190 ± 17	103 ± 19	19 ± 10
Pão de trigo com sementes	169 ± 22	165 ± 6	< LOQ
Pão Tigre	218 ± 30	118 ± 14	70 ± 22
Broa de Avintes	66 ± 16	90 ± 15	< LOQ

Os valores obtidos na Tabela 9.3 são semelhantes aos que se podem encontrar na literatura. [27] O pão tigre foi o tipo de pão com maior quantidade de DC e de PN. A broa de Avintes foi o único caso em que a concentração de PN foi superior à do DC. Nos restantes tipos de pão apresentados os resultados não têm diferença estatisticamente significativa. Na Figura 9.4 encontra-se representado um gráfico com vários cromatogramas sobrepostos referentes aos ensaios de um dos tipos de pão.

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

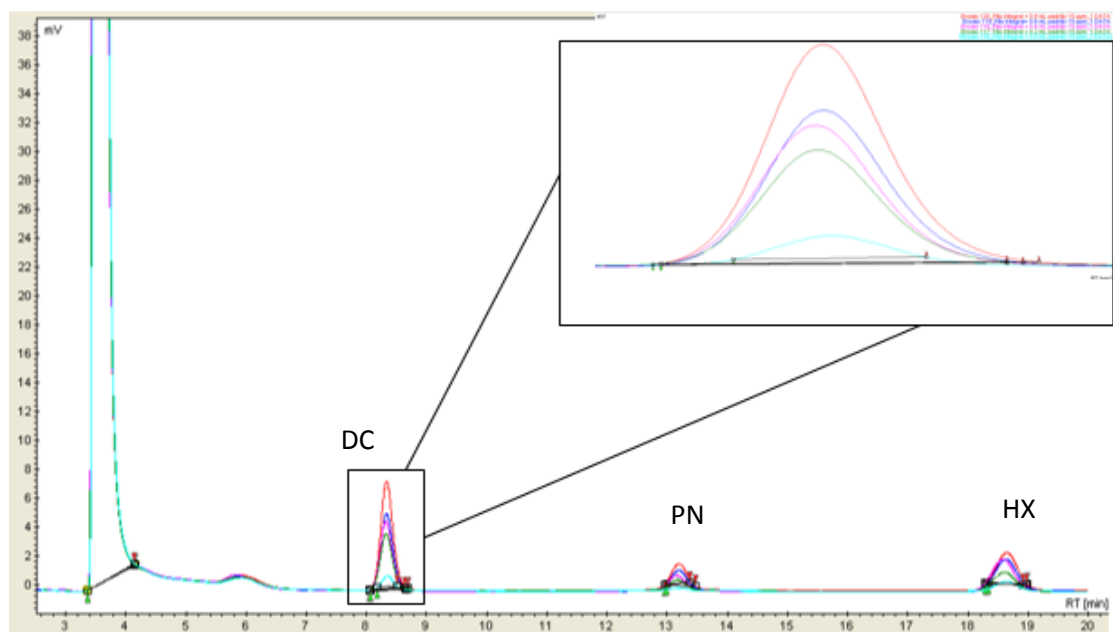


Figura 9.4 – Cromatogramas sobrepostos obtidos para os ensaios de um dos tipos de pão.

9.8 - Efeito da variação do teor dos compostos α -dicarbonílicos no pão ao longo de quatro dias

Neste estudo pretendeu-se avaliar a variação dos compostos α -dicarbonílicos no mesmo pão ao longo de vários dias. Utilizaram-se as condições de extração previamente otimizadas. O pão foi comprado no dia 1 e foi analisado durante 4 dias seguidos. A trituração era efetuada diariamente antes da extração e os ensaios eram sempre feitos em triplicado.

Variação ao longo de quatro dias dos compostos α -dicarbonílicos no pão

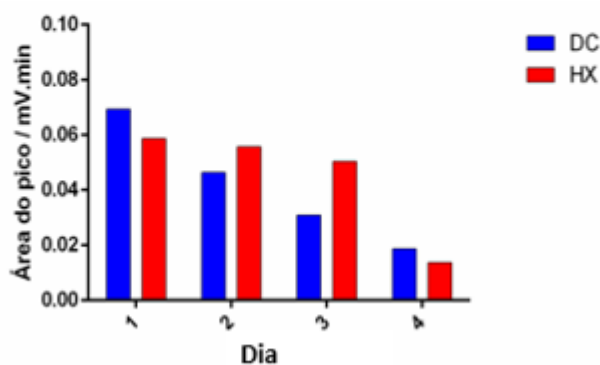


Figura 9.5 - Gráfico representativo da variação ao longo de quatro dias dos compostos α -dicarbonílicos no pão. Os ensaios foram realizados em triplicado e a moagem da amostra era feita antes de cada extração. As extrações foram efetuadas durante 15 min, a 65 °C e o volume da solução aceitadora 0,1 %, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, foi 0,5 mL.

O tipo de pão utilizado nestes ensaios foi diferente dos ensaios anteriores. Neste caso, a PN surgiu em quantidades muito reduzidas no dia 1 logo, desaparecendo nos dias seguintes, optou-se por não a colocar no gráfico. A PN não surgiu em nenhum dos ensaios. Verificou-se que a concentração dos α -dicarbonílicos diminuiu com o passar dos dias. Visto que a amostra ficava exposta ao meio ambiente entre os ensaios, a justificação para o sucedido pode estar relacionada com a volatilização dos compostos ao longo do tempo. Na Figura 9.5 encontra-se a evolução dos compostos ao longo deste estudo.

B – Determinação de aldeídos em cortiça

10 – Estudo e otimização dos parâmetros que influenciam o processo de extração na cortiça

À semelhança do que foi feito no estudo anterior também foi necessário realizar algumas otimizações no processo de extração, uma vez que se está a lidar com uma matriz e compostos diferentes. Estudaram-se três parâmetros relevantes: o tempo de extração, a temperatura de extração e a variação de volume da solução aceitadora.

10.1 – Influência do tempo de extração

Neste estudo foram determinadas as quantidades de diferentes aldeídos presentes na amostra em função do tempo de extração. Os aldeídos em questão são o furfural, o benzaldeído, o hexanal, o octanal, o nonanal, o decenal e o decanal. Os tempos estudados foram 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 min. Todos os ensaios foram realizados com 1 mL de DNPH e a 50 °C. O gráfico representativo do efeito do tempo de extração encontra-se na Figura 10.1.

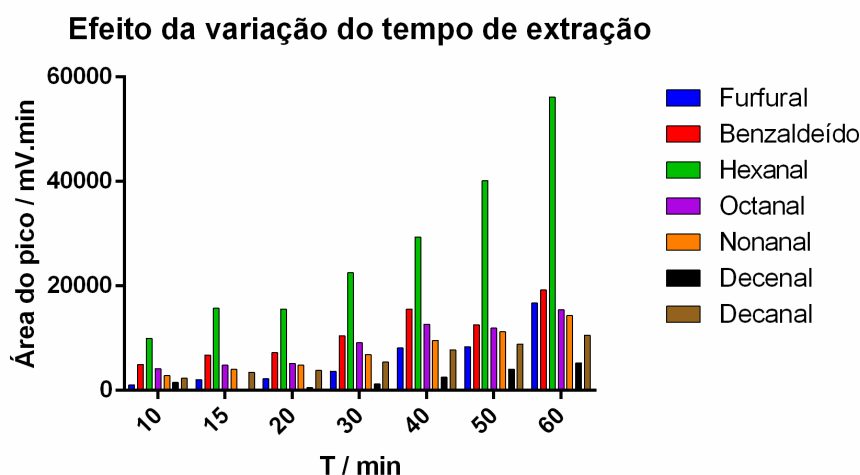


Figura 10.1 – Representação da variação das áreas dos picos dos aldeídos em função do tempo de extração. A solução aceitadora foi DNPH 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, e o volume 1,0 mL.

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

Foi escolhido um tempo que combinasse um curto período de espera com uma boa recolha. O tempo selecionado foi 15 min.

10.2 – Influência da temperatura de extração

Como se viu anteriormente, e uma vez que se estudam processos que dependem da volatilização de compostos, a temperatura à qual se realiza a extração é um parâmetro que deve ser corretamente controlado. Para este ensaio utilizaram-se como referência os seguintes aldeídos: o furfural, o benzaldeído, o octanal, o nonanal, o decenal e o decanal foram os compostos utilizados. Os ensaios decorreram durante 15 min e com 1 mL de DNPH. Na Figura 10.2 encontra-se o gráfico representativo do efeito da variação da temperatura de extração.

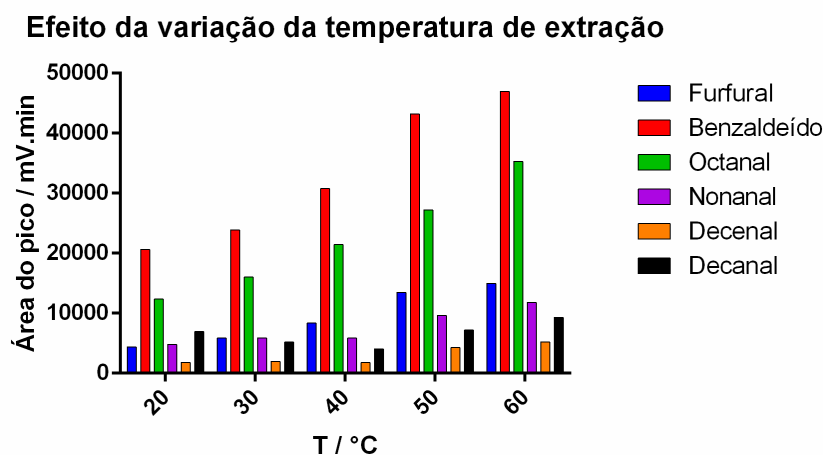


Figura 10.2 - Representação da variação das áreas dos picos dos aldeídos em função da temperatura de extração. O tempo utilizado 15 min. A solução aceitadora foi DNPH 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, e o volume 1,0 mL.

Visto que os resultados entre os 50 e os 60 °C não são muito diferentes, excetuando o hexanal, escolheu-se a temperatura 50 °C. A evaporação, fenómeno que surge com o aumento da temperatura, também contribuiu para a escolha desta temperatura.

10.3 – Influência da variação de volume da solução aceitadora, DNPH

O parâmetro da influência da variação de volume da solução aceitadora, DNPH, também foi estudado neste trabalho. Foram estudados 5 volumes diferentes (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mL), durante 15 min cada, a 50 °C. Devido ao efeito da concentração, quanto menor o volume, maior a área do pico. O gráfico representativo do efeito da variação do volume da solução aceitadora encontra-se na Figura 10.3.

Efeito da variação do volume da solução aceitadora

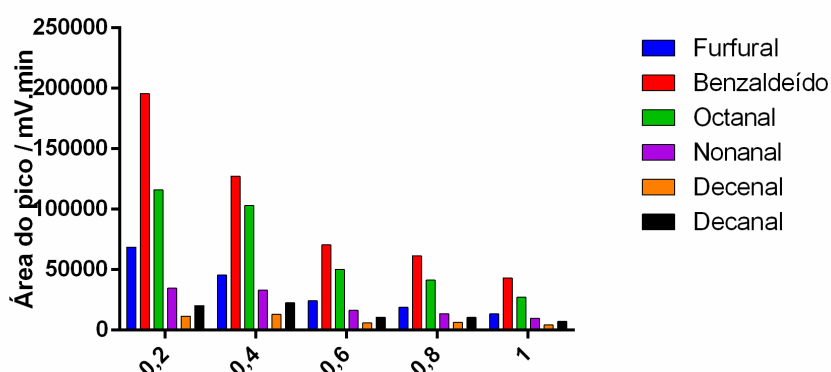


Figura 10.3 - Representação da variação das áreas dos picos dos aldeídos em função do volume da solução aceitadora. O tempo utilizado 15 min. A solução aceitadora foi DNPH 0,1%, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7, e o volume 1,0 mL.

O volume escolhido foi 1,0 mL visto que combinava uma quantidade suficiente para injetar no HPLC/UV com uma área do pico satisfatória. Apesar de para volumes inferiores, existirem áreas do pico melhores, a escolha foi 1,0 mL devido aos efeitos de evaporação. A solução aceitadora utilizada neste trabalho evapora mais facilmente do que no trabalho anterior logo o seu volume tem de ser maior.

10.4 – Variação da concentração de aldeídos nos diferentes passos da formação de uma rolha de cortiça

Como foi referido anteriormente, foram analisados todos os passos da produção industrial da rolha de cortiça e consequente determinação dos aldeídos presentes em cada etapa. Cada passo foi realizado em triplicado. De uma forma geral os aldeídos com maior predominância e que foram estudados foram o furfural, benzaldeído, hexanal,

octanal, nonanal, decanal, formaldeído, acetaldeído e pentanal. Na Tabela 10.1 encontram-se os valores das áreas dos picos de cada aldeído em cada passo do processo de formação da rolha. Verificou-se o aparecimento de alguns compostos em alguns passos; houve variação da área do pico dos vários aldeídos encontrados nas rolhas submetidas aos tratamentos Alfa e Sunrise e também existiu diferenças entre as marcações a fogo e a tinta. Estes tratamentos são baseados em lavações oxidantes com o objetivo de as branquear. No caso do tratamento Alfa a rolha fica toda branca enquanto no Sunrise fica com tons mais acastanhados característicos da cortiça. No primeiro caso, as situações mais relevantes prenderam-se com a formação do furfural a partir da esterilização. Este fato pode ser explicado com os tratamentos térmicos que acontecem neste passo. O aumento deste composto também é indicativo que estão a ocorrer reações de Maillard. [4] Outro caso semelhante aconteceu com o aldeído pentanal. A sua presença só surgiu a partir dos tratamentos Alfa e Sunrise. O benzaldeído manteve as suas quantidades constantes ao longo de todo o processo. O acetaldeído, o decanal, o formaldeído, o hexanal e o nonanal obtiveram valores mais elevados durante o tratamento Alfa. Quanto aos tratamentos, verificou-se que o tratamento Alfa originava áreas dos picos superiores comparativamente com o Sunrise. Finalmente, o tipo de marcação também teve resultados interessantes. Como o material aplicado era diferente, os resultados foram também diferentes. Os valores da marcação a tinta foram superiores aos da marcação a fogo. Pode se entender melhor as variações dos aldeídos ao longo dos diferentes passos visualizando as Figuras 10.4-10.12. Para uma desta etapas, em particular numa rolha com lavagem Alfa, resolveu-se proceder à quantificação dos aldeídos existentes na amostra, para tal recorrendo à adição de padrão. Os compostos que estão presentes em maior quantidade são o decanal, o formaldeído e o nonanal. Todos os outros surgem com concentrações semelhantes. Na Tabela 10.2 estão os valores das concentrações de cada aldeído durante a lavagem Alfa. Na Figura 10.13 encontram-se cromatogramas sobrepostos obtidos para a quantificação das rolhas com lavagem Alfa com diferentes concentrações de aldeídos.

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 10.1 - Áreas dos picos obtidos para os aldeídos estudados durante o processo de produção de rolhas de cortiça.

	Crua	Cozida	Esterilizada	Brocagem	Alfa	Sunrise	Alfa Fogo	Alfa Tinta	Sunrise Fogo	Sunrise Tinta	Alfa Parafina Fogo	Alfa Parafina Tinta	Sunrise Parafina Fogo	Sunrise Parafina Tinta
Furfural	0,00	0,00	11335,09	13253,58	3061,25	3273,95	3019,18	4646,17	4247,98	7394,80	3622,78	2446,71	3669,45	4937,43
Benzaldeído	2071,41	2156,70	2277,71	2609,81	2482,76	2483,51	2381,57	2632,14	2835,95	2732,99	2375,32	2771,42	2512,13	2793,38
Hexanal	2119,83	2635,13	3309,62	3221,35	6395,12	3662,31	5312,10	6097,84	4376,70	5001,86	6321,33	7776,53	3802,75	3544,42
Octanal	2245,36	1722,43	1972,35	1515,96	1185,68	0,00	1067,20	802,29	708,62	756,07	913,38	948,72	1020,20	1034,59
Nonanal	1599,15	1464,48	1746,88	1757,91	2573,57	3263,91	2283,26	2043,23	3251,80	3464,44	2389,40	2653,48	1084,52	1040,68
Decanal	2512,39	2208,77	2189,85	2223,96	4296,18	3263,91	5251,58	3587,21	3251,80	3464,44	2871,85	1124,36	1084,52	1040,68
Formaldeído	14784,00	11802,64	19635,94	13531,28	70096,64	19296,16	51879,84	54710,09	26193,70	26698,40	105887,11	166254,65	44601,30	32389,86
Acetaldeído	3414,42	7046,54	9530,53	10219,07	132208,33	10375,00	79825,02	65830,03	19149,18	24497,67	118112,58	159185,02	15710,61	9906,65
Pentanal	0,00	0,00	0,00	0,00	24764,89	24683,60	24566,01	24473,66	24446,15	25241,06	22654,38	23472,61	23991,98	23344,61

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

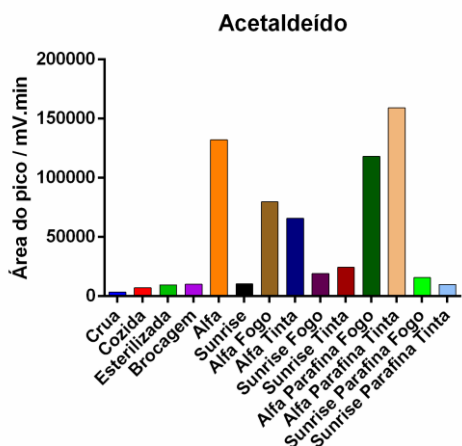


Figura 10.4 - Área do pico do acetaldeído em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.

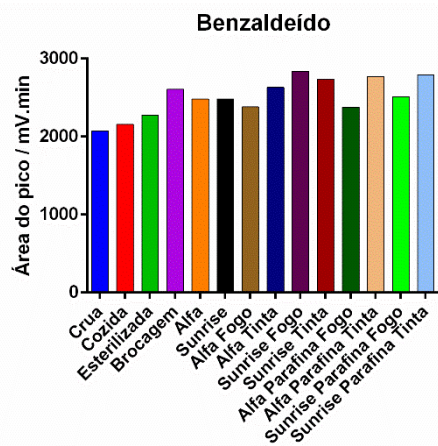


Figura 10.5 - Área do pico do benzaldeído em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.

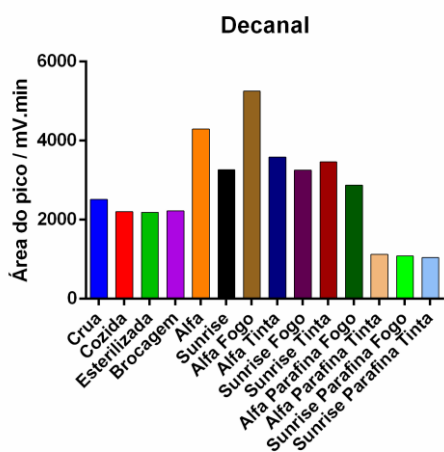


Figura 10.6 - Área do pico do decanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.

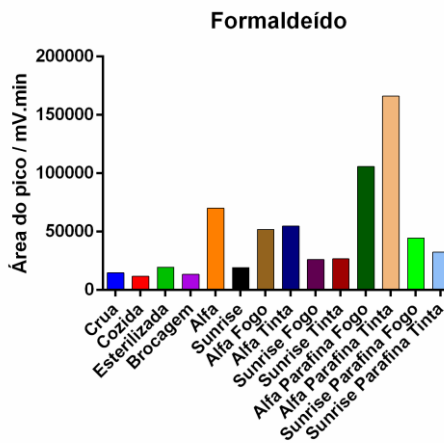


Figura 10.7 - Área do pico do formaldeído em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.

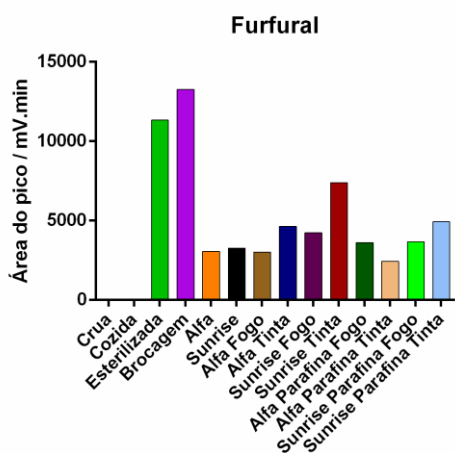


Figura 10.8 - Área do pico do furfural em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.

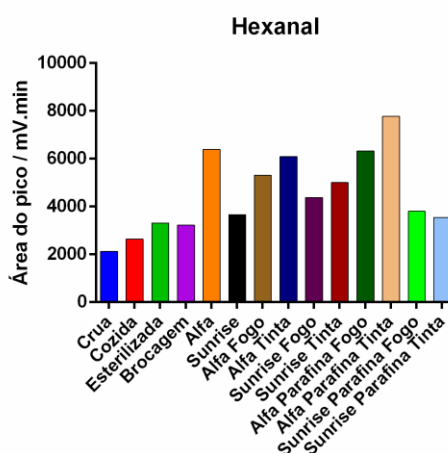


Figura 10.9 - Área do pico do hexanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

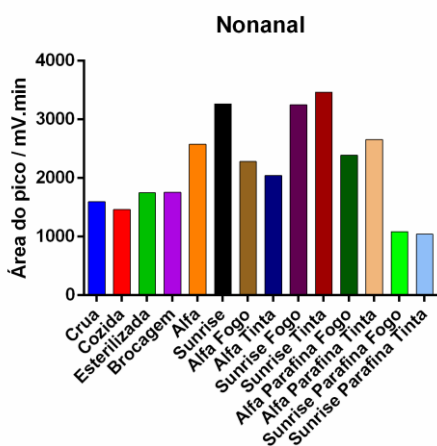


Figura 10.10 – Área do pico do nonanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.

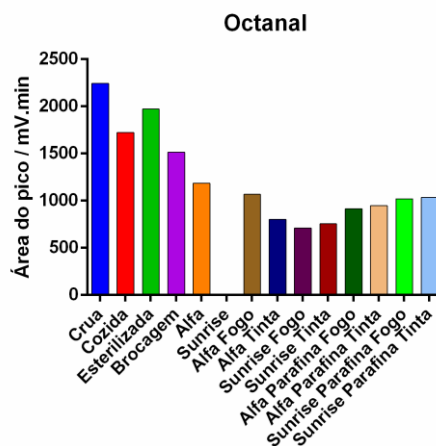


Figura 10.11 – Área do pico do octanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.

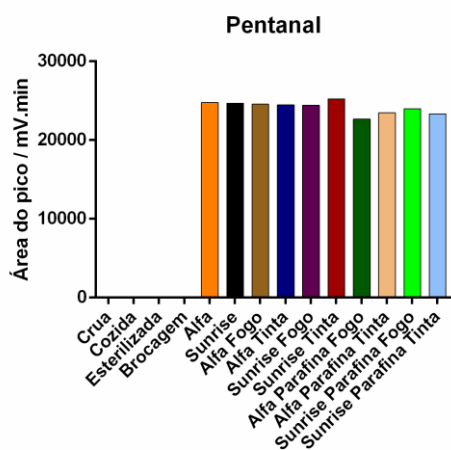


Figura 10.12 – Área do pico do pentanal em função do passo do processo de formação da rolha de cortiça.

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 10.2 - Concentrações obtidas para cada aldeído numa rolha com tratamento Alfa.

Amostra	[Lavagem Alfa] / $\mu\text{g Kg}^{-1}$
Furfural	561 \pm 37
Pentanal	557 \pm 46
Hexanal	496 \pm 30
Octanal	705 \pm 31
Benzaldeído	568 \pm 54
Nonanal	2129 \pm 432
Decanal	6857 \pm 772
Formaldeído	4052 \pm 1007
Acetaldeído	384 \pm 73

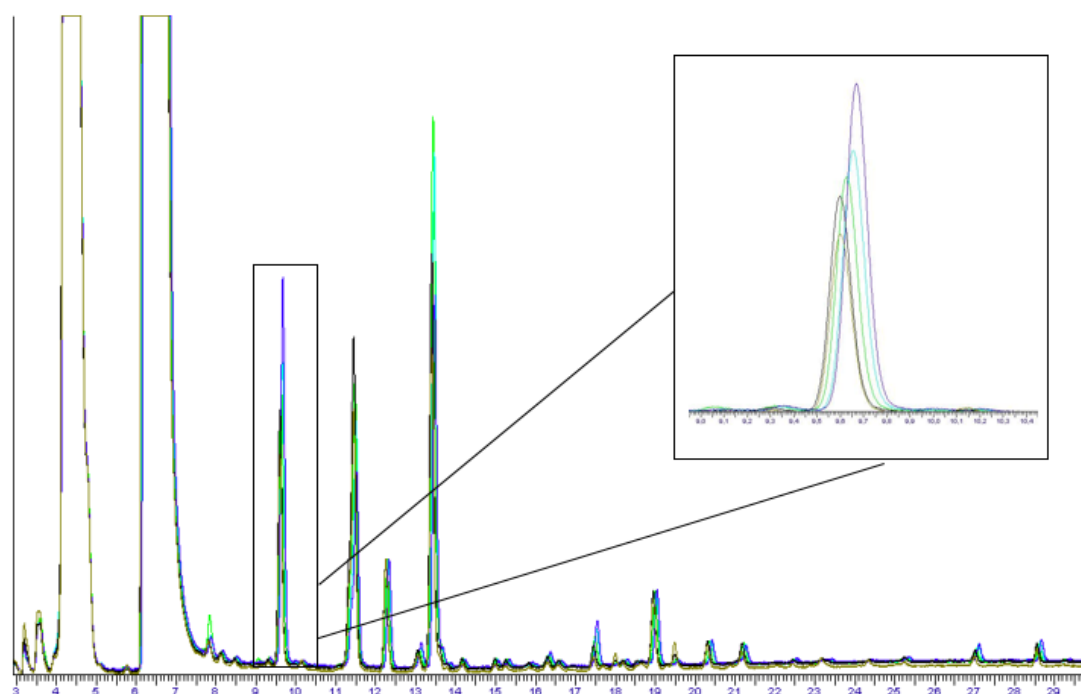


Figura 10.13 - Cromatogramas sobrepostos obtidos para a quantificação das rolhas com lavagem Alfa com diferentes concentrações de aldeídos. O *inlet* salienta o pico do formaldeído.

Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência

10.5 – Composição de 3 tipos de aglomerados diferentes

Neste ponto foram analisadas três rolhas aglomeradas com algumas diferenças. Duas foram fornecidas pela Laffite sendo uma com aglomerado e outra microaglomerado. A terceira foi adquirida numa loja comercial.

Composição de 3 tipos de aglomerados diferentes

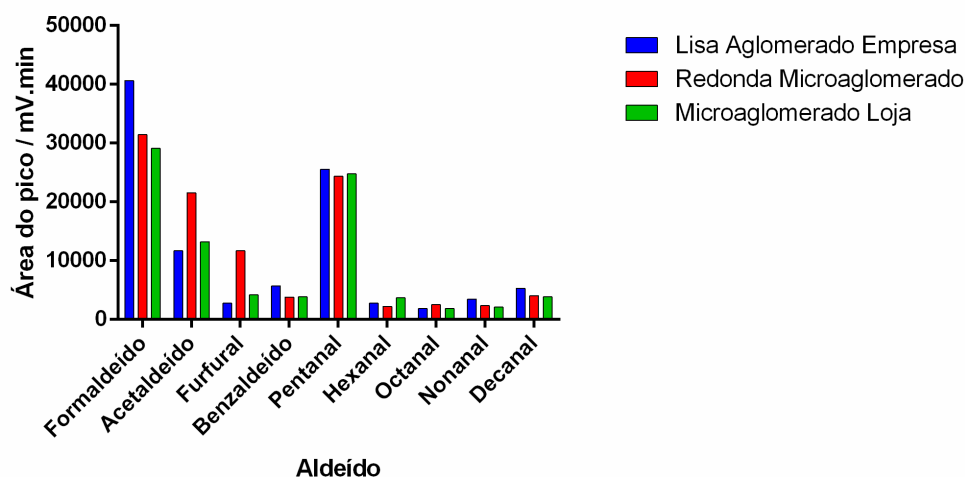


Figura 10.14 - Gráfico representativo da composição de 3 tipos de rolha de aglomerado diferentes.

O aspeto mais importante a salientar neste estudo é o fato de o furfural e o acetaldeído terem maior quantidade na rolha microaglomerada comparado com a aglomerada da empresa. A utilização de uma cola diferente para unir os micro pedaços de cortiça pode ser a explicação mais lógica para este fato assim como o maior tratamento térmico necessário. O gráfico representativo da composição dos 3 tipos de aglomerados diferentes encontra-se na Figura 10.14.

IV – CONCLUSÕES

Num primeiro trabalho pretendeu-se quantificar os compostos α -dicarbonílicos em diferentes tipos de pão. Optou-se por esta amostra visto que é dos alimentos mais consumidos pelos portugueses, por ser fácil de adquirir e por ser barata. De modo a facilitar o processo de extração realizaram-se vários ensaios de otimização tais como: a temperatura de extração, a variação do volume da solução aceitadora, o tempo de extração, o efeito da agitação e a diferença entre o módulo mergulhado vs módulo em *headspace*. Após estes estudos preliminares concluiu-se que as condições de extração ideais para o pão seriam 65 °C, durante 15 min, o volume da solução aceitadora 0,5 mL, módulo em *headspace* e sem agitação. A solução aceitadora utilizada foi a OFDA.

No segundo trabalho em que o objetivo era estudar a presença de aldeídos nos vários passos de produção de uma rolha de cortiça também foram realizados ensaios de otimização, mas neste caso apenas se avaliou o tempo de extração, a temperatura de extração e a variação do volume da solução aceitadora. As condições escolhidas foram: 20 min de extração, 50 °C e 1,0 mL de volume da solução aceitadora. A solução aceitadora escolhida foi o DNPH.

Os resultados do primeiro estudo foram bastante interessantes tendo-se obtido diferentes quantidades de compostos α -dicarbonílicos em diferentes tipos de pão. A variação ocorreu entre 66 e 218 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 88 e 118 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 19 e 83 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o DC, a PN e a HX respetivamente. Estas variações podem ser explicadas pelo fato de cada pão ter um processo de formação diferente, ingredientes diferentes e até fermentações distintas.

Relativamente ao estudo do processo de formação da rolha, os resultados também foram extremamente positivos. Alguns aldeídos mantêm a mesma quantidade ao longo de todo o processo enquanto que outros variam consideravelmente. O furfural, o caso mais díspar, só começou a surgir na rolha a partir do passo em que ocorre uma cozedura da cortiça. Este processo térmico pode explicar esta alteração.

A GDME comprovou ser um método excelente também para o estudo de amostras sólidas aumentando consideravelmente o espectro de análises que se podem efetuar com a sua utilização.

V – TRABALHO FUTURO

Ao conseguir-se comprovar a aplicabilidade da GDME em amostras sólidas, neste caso ao pão e à cortiça, a utilização deste equipamento para a análise de outras matrizes sólidas é o próximo passo. Já foram realizados alguns ensaios em grãos de café com resultados positivos.

Visto que o estudo dos diferentes passos do processo de formação de rolhas de cortiça ter sido bem-sucedido, uma das propostas que considero que deve ser seguida é a análise de outros processos semelhantes dada a simplicidade do processo de extração que poderá ser facilmente adaptado a controlos analíticos de rotina.

O estudo de compostos como os álcoois, as aminas, as amidas, entre outros deveria ser estudado em diferentes amostras de modo a expandir-se a utilidade desta técnica.

Tal como nos compostos referidos anteriormente, o estudo de outras soluções aceitadoras contendo derivatizante específicos também deve ser realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tannahill, R., *Food in History*. 1989: Crown Publishers.
2. Gil, L.M., *A Química da Cortiça: ponto de situação*. Química, 1993(50): p. 5.
3. Maga, J.A. and J.L. Puech, *Cork and alcoholic beverages*. Food Reviews International, 2005. **21**(1): p. 53-68.
4. Rocha, S., I. Delgadillo, and A.J.F. Correia, *Improvement of the volatile components of cork from Quercus suber L. by an autoclaving procedure*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(3): p. 872-876.
5. Ko, A.Y., et al., *Identification of volatile organic compounds generated from healthy and infected powdered chili using solvent-free solid injection coupled with GC/MS: Application to adulteration*. Food Chemistry, 2014. **156**: p. 326-332.
6. Bartowsky, E.J. and P.A. Henschke, *The 'buttery' attribute of wine - Diacetyl - Desirability, spoilage and beyond*. International Journal of Food Microbiology, 2004. **96**(3): p. 235-252.
7. Rodrigues, J.A., A.A. Barros, and P.G. Rodrigues, *Differential pulse polarographic determination of α -dicarbonyl compounds in foodstuffs after derivatization with o-phenylenediamine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(8): p. 3219-3222.
8. Santos, C.M., et al., *Chromatographic analysis of methylglyoxal and other α -dicarbonyls using gas-diffusion microextraction*. Analyst, 2013. **138**(23): p. 7233-7237.
9. Papetti, A., D. Mascherpa, and G. Gazzani, *Free α -dicarbonyl compounds in coffee, barley coffee and soy sauce and effects of in vitro digestion*. Food Chemistry, 2014. **164**: p. 259-265.
10. Mink, R., et al., *Time course of diacetyl formation during vinification with Saccharomyces cerevisiae and Oenococcus oeni co-cultivation*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2014. **20**(2): p. 194-198.
11. Ramos, R.M., et al., *Determination of free and total diacetyl in wine by HPLC-UV using gas-diffusion microextraction and pre-column derivatization*. Food Control, 2012. **24**(1-2): p. 220-224.
12. Davidović, D.N., et al., *The application of natural organic compounds in bakery industry*. Hemijska Industrija, 2010. **64**(5): p. 411-421.
13. Köhler, P. and W. Grosch, *Study of the effect of DATEM. 1. Influence of fatty acid chain length on rheology and baking*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(5): p. 1863-1869.
14. Xiujin, Z., S. Jinqun, and L. Zaigui, *Effects of DATEM on dough rheological characteristics and qualities of CSB and bread*. Cereal Chemistry, 2007. **84**(2): p. 181-185.
15. Ullmann, F., et al., *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*. 1995: VCH.
16. Zhang, J., Q. He, and P.J. Liroy, *Characteristics of aldehydes: Concentrations, sources, and exposures for indoor and outdoor residential microenvironments*. Environmental Science and Technology, 1994. **28**(1): p. 146-152.
17. Chira, K. and P.L. Teissedre, *Relation between volatile composition, ellagitannin content and sensory perception of oak wood chips representing different toasting processes*. European Food Research and Technology, 2013. **236**(4): p. 735-746.
18. Pacheco, J.G., et al., *Gas-diffusion microextraction*. Journal of Separation Science, 2010. **33**(20): p. 3207-3212.

19. *Chapter 18 Chemical reactions used in derivatization*, in *Journal of Chromatography Library*. 2002. p. 525-637.
20. Deyl, Z., I. Mikšík, and E. Tesařová, *Chapter 4 Selected Derivatization Reactions*, in *Journal of Chromatography Library*. 1998. p. 141-196.
21. Degen, J., M. Hellwig, and T. Henle, *1,2-Dicarbonyl compounds in commonly consumed foods*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **60**(28): p. 7071-7079.
22. Raju, B.C., N.D. Theja, and J.A. Kumar, *Efficient and inexpensive synthesis of benzimidazoles and quinoxalines*. *Synthetic Communications*, 2009. **39**(1): p. 175-188.
23. Lin, Y.L., et al., *Determination of linear aliphatic aldehydes in heavy metal containing waters by high-performance liquid chromatography using 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization*. *Journal of Chromatography A*, 2009. **1216**(36): p. 6377-6381.
24. Gonçalves, L.M., et al., *Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: Characterization by high-performance liquid chromatography-diode-array detection-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(24): p. 3717-3722.
25. Luque de Castro, M.D. and F. Priego-Capote, *Soxhlet extraction: Past and present panacea*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(16): p. 2383-2389.
26. Ahmad, S., *Is SPME a destination or just another station for bioanalysis?* *Bioanalysis*, 2013. **5**(23): p. 2897-2901.
27. Birch, A.N., et al., *Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles*. *Food Research International*, 2013. **52**(1): p. 160-166.