

ValorNatural – Valorização de Recursos Naturais através da Extração de Ingredientes de Elevado Valor Acrescentado para Aplicações na Indústria Alimentar.

Entregável nº 4.2.2

Versão do Documento: 1

Data de Submissão: 31/08/2021

Responsável: UP (FEUP-LSRE)

Nome do Documento: Relatório com os procedimentos de constituição dos modelos de aromas

Histórico de Revisão

Revisão	Data	Parceiros Envolvidos	Descrição

Lista de Autores

Madalena Dias

Isabel Martins

Vanessa Vieira

Andreia Ribeiro

Catarina Moreira

Yaidelin Manrique

Resumo

A atividade 4.2 “Desenvolvimento de modelos de aromas para a indústria de panificação” visa o estudo / avaliação organolética de produtos de panificação contendo os aromas naturais obtidos e análise e reconstituição de aromas libertados no processo de cozedura de produtos de panificação. O presente entregável destina-se à apresentação de resultados de análises de olfatométrica das principais moléculas voláteis que conferem o odor do pão bem como o processo analítico envolvido para a posterior modelação destes mesmos aromas. Desta forma, o valor de *Odor Detection Threshold* (ODT) das moléculas analisadas na Atividade 4.2.1 “Avaliação organolética de produtos de panificação incorporando os aromas naturais” foi determinado pela técnica de olfatométrica com recurso a 4 avaliadores em diferentes sessões. De acordo com o ODT determinado para cada molécula, aliando os demais ensaios laboratoriais de quantificação e posterior modelação, foi realizada a reconstituição do odor do pão com base nas principais moléculas identificadas no seu aroma.

Concretamente, no âmbito da modelação de aromas, após a sua caracterização química, fez-se um levantamento da literatura sobre as propriedades físico-químicas e termodinâmicas dos voláteis gerados durante a cozedura do pão (3-metil-1-butanol, furfural, 2-furanometanol e γ -butirolactona) com vista a testes de modelação do equilíbrio de fases líquido-vapor (VLE) de misturas recorrendo ao método UNIFAC (*Universal quasichemical Functional group Activity Coefficients*). Com este passo pretendeu-se determinar a composição da fase líquida que proporcionará o odor característico a pão acabado de cozer.

Índice

1	Identificação	5
2	Informação	6

1 Identificação

<i>Deliverable</i>	E 4.2.2. Relatório com os procedimentos de constituição dos modelos de aromas
Tipo de <i>deliverable</i>	Relatório
Nível de disseminação	Confidencial
PPS	4. Aromas naturais e modelos de aromas

2 Informação

- Determinação do ODT das moléculas alvo

De acordo com a Atividade 4.2.1 “Avaliação organolética de produtos de panificação incorporando os aromas naturais”, onde foi caracterizado o perfil de voláteis presente em amostras de miolo e crosta de pão, o aroma gerado durante a sua cozedura foi também monitorizado. As moléculas álcool isopentílico (3metil-1-butanol), furfural, álcool furfurílico e γ -butirolactona foram os aromas maioritários e, portanto, de interesse para a determinação de propriedades relevantes com vista à sua reconstituição como o ODT individual de cada uma delas, atendendo à deficiente abundância em dados na literatura. Desta forma, o ODT destas moléculas foi determinado pela técnica de olfatometria.

O ODT no ar foi determinado utilizando um Olfatómetro Ecoma - modelo TO7 (Figura 1 A e B) e seguindo as normas VDI3881 e EN13725. A amostra de gás da molécula de interesse foi preparada em sacos específicos de amostras para gás (Nanoplan) de 5 L (Figura 1 C). Para tal, uma quantidade conhecida de odor foi misturada dentro do saco de amostragem com ar neutro (ar comprimido respirável composto por 79 % azoto e 21 % oxigénio, da Linde Portugal, ref.: UN1002). Considerou-se que o equilíbrio foi atingido deixando o saco repousar durante 1 h à temperatura ambiente (Anexo A) [1]. No final, o saco de amostragem foi conectado ao olfatómetro através do tubo de PTFE e procedeu-se à avaliação do ODT de cada molécula



Figura 1: registo fotográfico do olfatómetro modelo Ecoma TO7 (A e B) e saco de amostragem – Nanoplan 5 L (C).

De uma forma breve, o odor é sugado do saco de amostragem e intensivamente misturado com ar neutro. O odor diluído é direcionado de forma alternada até aos *sniffing ports* do avaliador 1 até ao avaliador 4. A medição é realizada automaticamente e controlada pelo *software* do equipamento. A sequência da medição termina quando houver 2 respostas positivas consecutivas em pelo menos 50% dos avaliadores. Cada medição é composta por um conjunto de 3 sequências. No final o *software* reporta os resultados das diluições

onde foi detetado pela primeira vez o odor (Anexo B). Estes resultados foram registados numa folha de ensaio (Anexo C) onde constam todas as informações relevantes para o efeito.

O princípio da medição do valor de ODT de um determinado composto químico é baseado em diluições precisas realizadas pelo olfatómetro a partir da amostra com concentração conhecida e ar neutro.

De acordo com a literatura [2] as condições experimentais para os ensaios foram fixadas em:

- Fator de diluição: 2
- Variação de diluição: 2,5 - 640
- Sequências: 3
- Intervalo entre sequências: 60 s
- Número de avaliadores: 4
- Tempo de inalação: 2,2 s
- Fluxo de ar de entrada: 1,5 m³/h
- Tipo de ar: ar comprimido neutro
- Pressão de gás na entrada: 4×10^5 Pa
- Pressão no olfatómetro: $1,9 \times 10^5$ Pa
- Temperatura ambiente: 298 K

O ODT de cada molécula no ar é calculado através da seguinte equação:

$$ODT_i = \frac{C_i^0}{Z_i^{thr}} \quad 1$$

onde, C_i^0 corresponde à concentração inicial do gás da molécula i dentro do saco de amostragem (g/m³), que é calculado de acordo com:

$$C_i^0 = \frac{P_i^{sat} V_i M_i}{R T V_{bag}} \quad 2$$

onde, P_i^{sat} é a pressão de saturação da molécula i (Pa), V_i corresponde ao volume de odor adicionado ao caso de amostragem (m³), M_i é o peso molecular do composto i (g/mol), R a constante de gás ideal (8,31 Pa/(K.mol)), T a temperatura do saco de amostragem (K) e V_{bag} o volume do saco de amostragem (m³).

O fator de diluição *threshold* do composto i , Z_i^{thr} , é calculado após duas respostas positivas consecutivas da seguinte forma:

$$Z_i^{\text{thr}} = 10^M \quad 2$$

onde M é a média aritmética dos logarítmicos das diluições *threshold* detetadas. O expoente M é calculado da seguinte forma:

$$M = \frac{\sum_{k=1}^4 \sum_{l=1}^3 \log_{10}(Z_{k,l}^{\text{thr}})}{L} \quad 3$$

onde $Z_{k,l}^{\text{thr}}$ representa a diluição *threshold* para o avaliador k na sequência l e L o total de avaliadores. $Z_{k,l}^{\text{thr}}$ é calculado de acordo com a seguinte equação:

$$Z_{k,l}^{\text{thr}} = \sqrt{Z_N \times Z_{N-1}} \quad 4$$

Z_N é a diluição onde foi detetado pela primeira vez o odor, i.e., a primeira resposta positiva e Z_{N-1} é a diluição anterior à resposta positiva onde não foi detetado odor.

Tendo as condições de operação otimizadas (equipamento e concentração da molécula no saco de amostragem), segue-se para a análise dos ODT. Para tal, as informações químicas para cada molécula de interesse encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Informação química das moléculas: álcool furfurílico, furfural, γ -butirolactona e álcool isopentílico.

Nome comum	Nome IUPAC	Fórmula	CAS	Pureza	Fornecedor
Álcool furfurílico	(furan-2-il)metanol	$C_5H_6O_2$	98-00-0	98%	Aldrich
Furfural	furan-2-carbaldeído	$C_5H_4O_2$	98-01-1	$\geq 98\%$	Aldrich
γ -Butirolactona	oxolan-2-ona	$C_4H_6O_2$	96-48-0	$\geq 99\%$	Aldrich
Álcool isopentílico	3-metilbutan-1-ol	$C_5H_{12}O$	123-51-3	99,7%	VWR

A Tabela 2 sumariza os valores de peso molecular e de pressão de saturação de cada molécula em estudo retirados da literatura. Nesta tabela são também reportados os valores experimentais de ODT determinados para as moléculas de interesse a 25 °C. Neste contexto, os ensaios foram realizados por 4 avaliadores do sexo feminino não treinados, com idades compreendidas entre os 29 e 38 anos.

Os valores apresentados correspondem à média geométrica de todas as respostas válidas dos avaliadores. Os ensaios foram realizados em triplicado por avaliadores não treinados (narizes não treinados) de forma a garantir valores de ODT aproximados ao de qualquer indivíduo comum. Comparando os valores de ODT obtidos para cada molécula é possível observar dois grupos distintos de moléculas; um em que é necessário menor ($<1 \text{ mg/m}^3$) e outro maior ($>1 \text{ mg/m}^3$) quantidade de amostra para que o seu odor seja perceptível num mesmo volume de 1 m^3 . Por comparação entre as quatro moléculas estudadas, o álcool isopentílico apresentou o valor de ODT mais baixo ($0,08 \text{ mg/m}^3$), seguido do furfural ($0,13 \text{ mg/m}^3$), álcool furfurílico ($1,32 \text{ mg/m}^3$) e por último da molécula γ -butirolactona ($9,11 \text{ mg/m}^3$), que apresentou o valor de ODT mais alto.

Tabela 2: Informação de cada molécula em estudo considerando temperatura e constante R igual a 298 K e $8,31446 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{K mol}$, respetivamente.

Molécula	M_i (g/mol)	P_i^{sat} (Pa)*	ODT (mg/m^3)
Álcool isopentílico	88,15	295	0,08
Furfural	96,08	169	0,13
Álcool furfurílico	98,1	86	1,32
γ -Butirolactona	86,09	149	9,11

* Yaws, Carl L Narasimhan, Prasad, K. Gabbula, Chaitanya. (2009). *Yaws' Handbook of Antoine Coefficients for Vapor Pressure (2nd Electronic Edition) - Vapor Pressure of Organic Compounds*. Knovel. Retrieved from: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt006AF2P1/yaws-handbook-antoine/vapor-pressure-organic>

A concentração no saco de amostragem permitiu que o ensaio da com álcool isopentílico, furfural e álcool furfurílico fossem de fácil identificação para os avaliadores, sendo o *threshold* facilmente detetado durante o ensaio e de forma coerente. Relativamente à molécula de γ -butirolactona o valor de ODT foi consideravelmente o mais alto. Esta molécula possui um odor fraco, tal como descrito na literatura [3] e, por consequência, mais difícil na determinação do seu ODT pelo grupo de avaliadores, independentemente da concentração preparada no saco de amostragem.

No entanto, tendo como comparação valores de ODT referência da literatura, os valores aqui reportados corroboram os existentes. Por exemplo, na literatura o ODT no ar para o furfural é de 0,008, 0,25, 0,98, 1 ou $2,8 \text{ mg/m}^3$ [4] e para o álcool isopentílico varia entre 0,0061 e $6,3 \text{ mg/m}^3$ [4]. No que respeita ao ODT do álcool furfurílico e γ -butirolactona o valor determinado foi uma ordem de grandeza abaixo do reportado na literatura, 32 mg/m^3 [4] e 70 – 176 mg/m^3 [5], respetivamente.

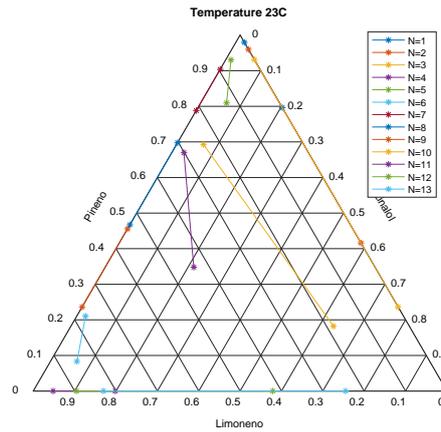
Por fim, é expectável que valores de ODT apresentem alguma disparidade com a literatura, uma vez que está diretamente relacionado a diversos fatores biológicos de cada avaliador (ex: idade, género e sensibilidades a odores). Apesar de haver disponíveis na literatura compilações de valores ODT para alguns compostos, estas compilações permanecem incompletas devido ao grande número de moléculas existentes, como também ao baixo número de valores de ODT determinados para a mesma molécula.

- Avaliação do método UNIFAC para modelação de aromas

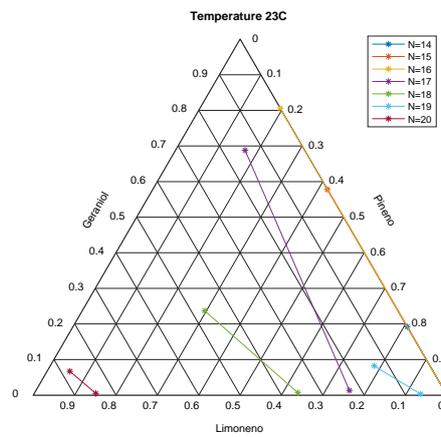
Para determinar a composição de equilíbrio líquido-vapor (VLE) de diversas misturas, foram desenvolvidas funções em MATLAB com o objetivo de obter modelos de aromas para a indústria de panificação. De acordo com o *know-how* do grupo de investigação LSRE-LCM, o método UNIFAC revelou ser um modelo adequado na previsão do odor de misturas de fragrâncias [6]. O método UNIFAC avalia a interação molecular dos grupos funcionais das moléculas que compõem uma mistura líquida.

Numa primeira fase, foram reproduzidos os resultados obtidos do VLE de diversos sistemas (binários, ternários e quaternários) de acordo com os resultados experimentais obtidos por Teixeira *et al.* (2011) [6], nomeadamente misturas com limoneno, linalol, α -pineno, geraniol, acetato de linalol, vanilina e etanol.

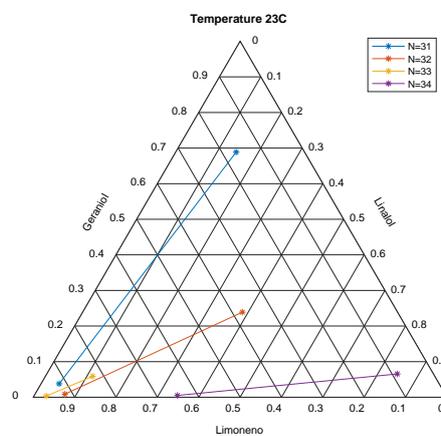
A Figura 2 representa num diagrama ternário o equilíbrio a 23 °C, para os sistemas ternários compostos por: (a) limoneno-linalol-pineno, (b) limoneno-pineno-geraniol e (c) limoneno-linalol-geraniol; onde as composições de equilíbrio, determinadas pelo método UNIFAC, na fase líquida e vapor estão unidas por uma linha contínua. Os resultados da fração molar no vapor foram concordantes com os dados experimentais reportados por Teixeira *et al.* (2011) [6].



a)



b)



c)

Figura 2. Representação da composição líquida e a sua respetiva composição de vapor a 23 °C para o sistema ternário, a) limoneno-linalol-pineno b) limoneno-pineno-geraniol e c) limoneno-linalol-geraniol.

De seguida, foi avaliado o efeito de duas considerações diferentes dos grupos UNIFAC para o álcool furfurílico, no VLE do sistema composto por 2,5-dimetilfurano e álcool furfurílico para a temperatura de 40 °C. Como previamente referido, o método UNIFAC calcula o coeficiente de atividade com base na interação molecular dos grupos funcionais

das moléculas. Contudo, em alguns casos, a atribuição dos grupos UNIFAC não é evidente, como o presente caso (álcool furfurílico). As considerações dos grupos moleculares UNIFAC que foram assumidas para o álcool furfurílico constam na **Error! Reference source not found.**

Tabela 3. Considerações moleculares do método UNIFAC para as moléculas 2,5-dimetilfurano e álcool furfurílico.

Main Group	Subgroup	2,5-Dimetilfurano	Álcool furfurílico Caso-A	Álcool furfurílico Caso-B
1	1	2	-	-
1	2	-	1	1
2	6	-	1	-
2	8	2	1	2
5	14	2	1	1
13	26	1	1	1

Os resultados do VLE do sistema por 2,5-dimetilfurano e álcool furfurílico obtido usando o método UNIFAC foram comparados com os obtidos experimentalmente por Negadi *et al.* (2014) [7]. Os resultados obtidos apresentam-se na **Error! Reference source not found.**, onde a linha azul descreve o VLE do 2,5-dimetilfurano no sistema binário: 2,5-dimetilfurano e álcool furfurílico, obtido com o método de UNIFAC para as duas considerações de grupos moleculares do álcool furfurílico. Os pontos amarelos representam os resultados obtidos experimentalmente por Negadi *et al.* (2014) [7]; o desvio padrão é $< 3\%$ quando comparados com dados experimentais para ambas considerações de grupos UNIFAC do álcool furfurílico.

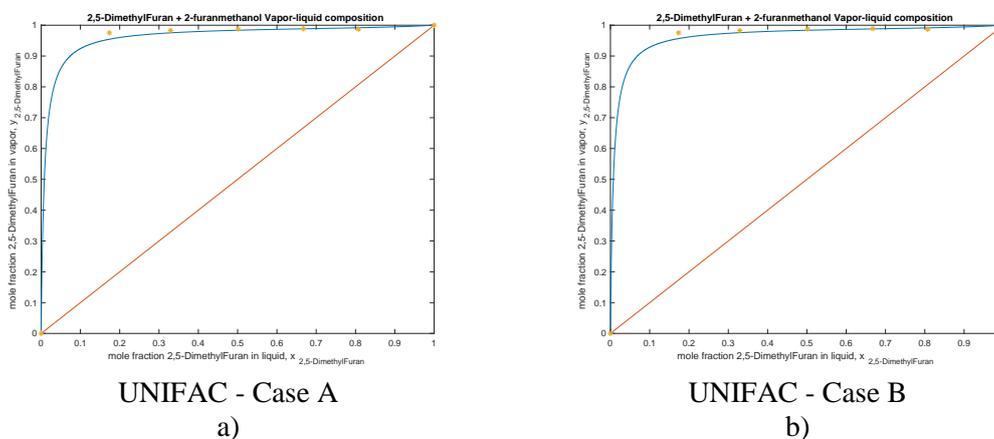


Figura 3. Equilíbrio líquido-vapor para o sistema binário 2,5-dimetilfurano e álcool furfurílico à 40 °C. álcool furfurílico: a) Case-A; b) Case-B.

Este resultado foi fundamental para as seguintes tarefas, já que o álcool furfurílico é uma das moléculas encontradas no aroma do pão. Como previamente referido, o método UNIFAC calcula o coeficiente de atividade com base na interação molecular dos grupos funcionais das moléculas. Contudo, em alguns casos, a atribuição dos grupos UNIFAC não é evidente, como o presente caso (álcool furfurílico).

- Modelação das moléculas alvo

A composição do aroma do pão durante a cozedura foi utilizada como ponto de partida deste processo. Numa primeira abordagem, a modelação dos aromas em estudo passou pela avaliação do efeito da adição de solvente para efeitos de diluição, mantendo constante a composição das moléculas alvo na fase de vapor (Tabela 4). A análise da fase de vapor fez-se sempre com recurso a fibras SPME nas condições otimizadas (temperatura = 23 °C; equilíbrio \geq 12h; exposição da fibra = 11 min).

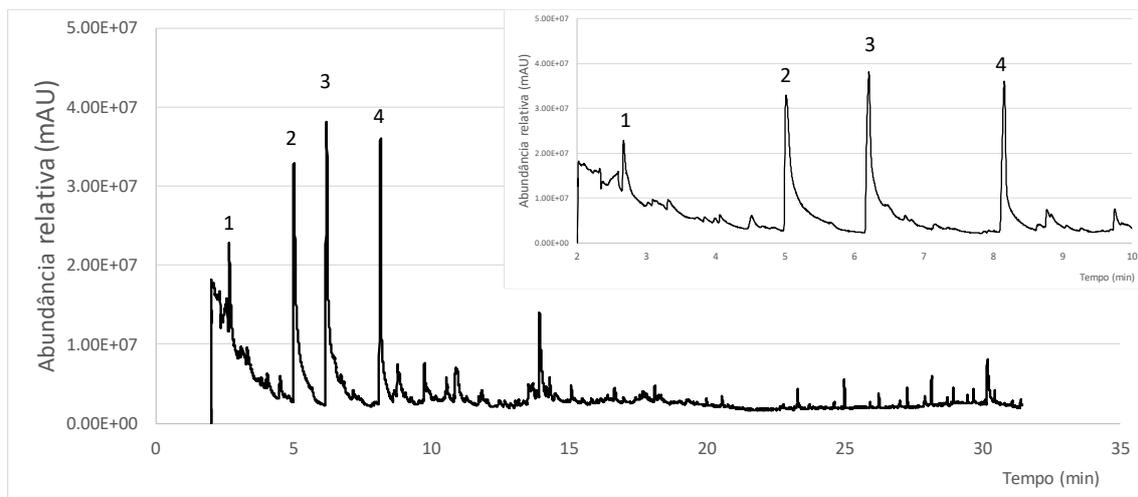


Figura 4. Cromatograma dos aromas libertados durante a cozedura de pão. 1: álcool isopentílico; 2: furfural; 3: álcool furfurílico; 4: γ -butirolactona.

Tabela 4. Quantificação dos aromas predominantes durante a cozedura de pão.

Identificação		Quantificação	
Nº	Molécula	Área (média)	Abundância relativa (%)
1	Álcool isopentílico	1.63×10^7	4.26
2	Furfural	1.23×10^8	32.31
3	Álcool furfurílico	1.32×10^8	34.56
4	γ -Butirolactona	1.10×10^8	28.87

Deste modo, determinou-se o VLE para o sistema ternário composto por: furfural, álcool furfurílico, γ -butirolactona. Estes três compostos foram selecionados por serem os componentes maioritariamente detetados nos perfis aromáticos dos produtos de panificação (Entregável 4.2.1, ponto *iii*, Figura 1). O equilíbrio foi calculado para duas temperaturas: 23 °C e 40 °C, que correspondem à temperatura ambiente e a temperatura em que a fibra SPME é exposta no processo de adsorção dos aromas no processo de cozedura do pão, respetivamente. Na Tabela 5 encontram-se sumarizadas as propriedades destes compostos necessárias para a modelação do VLE.

 Tabela 5. Propriedades obtidas para cada uma das moléculas, fórmula molecular, massa molar (MW), pressão de vapor a 23 °C e 40 °C (P_{sat}) e temperatura de ebulição (T_b).

Molécula	Fórmula	MW	Pvap@23°C	Pvap@40°C	T _b °C
			Pa	Pa	
Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	96.07	144.8	495.1	162
Álcool furfurílico	C ₅ H ₆ O ₂	98.1	73.9	255.7	170
γ-Butirolactona	C ₄ H ₆ O ₂	86.09	133.3	334.2	204
Etanol	C ₂ H ₆ O	46.06	7885.8	19318.6	78
1,2-Propanodiol	C ₃ H ₈ O ₂	76.09	20.8	74.8	460

A **Error! Reference source not found.**a,b representa o VLE num diagrama ternário o resultante da modelação do sistema composto por furfural, álcool furfurílico e γ -butirolactona, a 23 e 40 °C, respetivamente. Na **Error! Reference source not found.**c é possível verificar a composição das fases de vapor em equilíbrio a 23 e 40 °C de uma

mesma fase líquida a uma determinada fração molar. Tal como espectável, o aumento da temperatura aumenta a fração molar dos compostos mais voláteis na fase vapor.

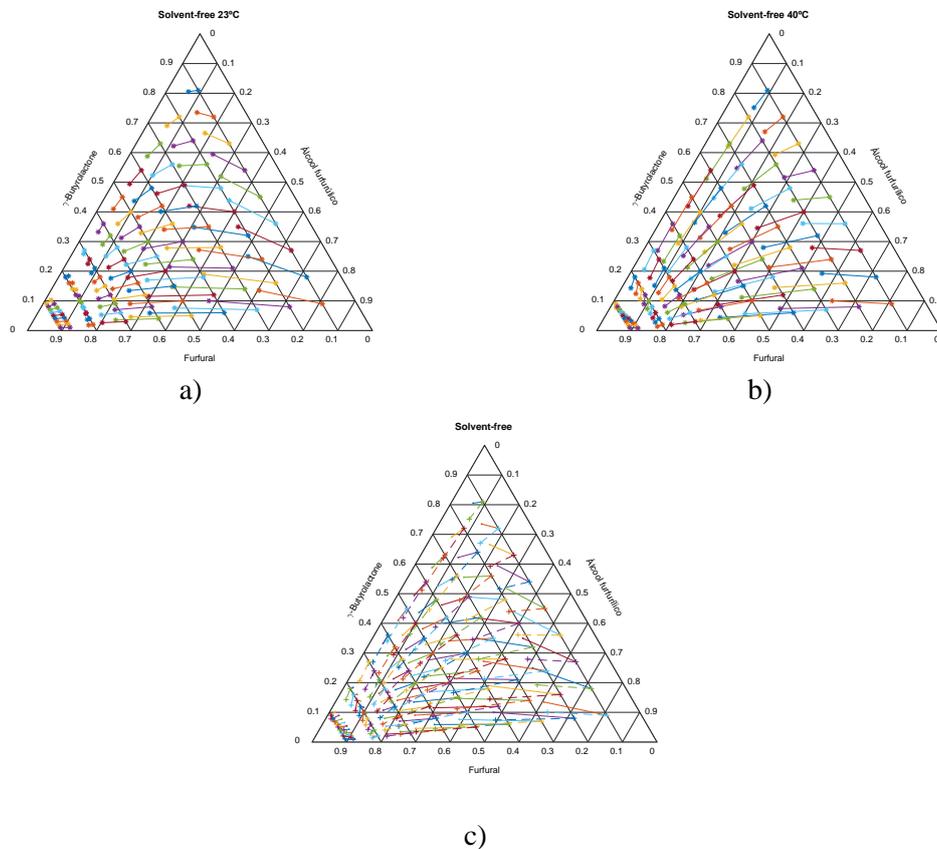


Figura 5. Representação do equilíbrio líquido-vapor para o sistema ternário furfural – álcool furfurílico – γ -butirolactona a 23 °C (a), 40 °C (b), e 23 e 40 °C (c).

Para além da temperatura, foi também avaliado o efeito da adição de um solvente à mistura: etanol e 1,2-propanodiol. A Tabela 6 apresenta as frações molares para cada fase em equilíbrio. Os resultados obtidos evidenciam que ao introduzir o etanol a fração no vapor é principalmente o solvente, isto como consequência da sua volatilidade. Por exemplo, quando a fração molar do etanol na fase líquida é 20%, a fase de vapor em equilíbrio é composta por mais de 95% da mesma molécula.

Tabela 6. Composições no líquido e no vapor em equilíbrio a 23 °C determinadas pelo método UNIFAC na presença de etanol.

Nº	Fração molar - Líquido				Fração molar - Vapor			
	x_{furfural}	$x_{\text{álc.furfurílico}}$	$x_{\text{butirolactona}}$	x_{etanol}	y_{furfural}	$y_{\text{álc.furfurílico}}$	$y_{\text{butirolactona}}$	y_{etanol}
1-a	0.1000	0.4500	0.4500	0.0000	0.1797	0.3009	0.5194	0.0000
2-a	0.4000	0.3000	0.3000	0.0000	0.5258	0.1983	0.2759	0.0000
3-a	0.8000	0.1000	0.1000	0.0000	0.7955	0.1088	0.0956	0.0000
4-a	0.0800	0.3600	0.3600	0.2000	0.0072	0.0110	0.0222	0.9596
5-a	0.3200	0.2400	0.2400	0.2000	0.0250	0.0078	0.0136	0.9536
6-a	0.6400	0.0800	0.0800	0.2000	0.0359	0.0030	0.0040	0.9571
7-a	0.0600	0.2700	0.2700	0.4000	0.0034	0.0048	0.0114	0.9803
8-a	0.2400	0.1800	0.1800	0.4000	0.0127	0.0034	0.0073	0.9766
9-a	0.4800	0.0600	0.0600	0.4000	0.0213	0.0013	0.0023	0.9751
10-a	0.0400	0.1800	0.1800	0.6000	0.0020	0.0026	0.0071	0.9883
11-a	0.1600	0.1200	0.1200	0.6000	0.0076	0.0018	0.0047	0.9859
12-a	0.3200	0.0400	0.0400	0.6000	0.0140	0.0007	0.0016	0.9837

Atendendo à alta volatilidade do etanol, selecionou-se um outro álcool comumente utilizado em perfumaria, mas menos volátil – o 1,2-propanodiol – e procedeu-se ao mesmo estudo. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para o novo sistema furfural – álcool furfurílico – γ -butirolactona – 1,2-propanodiol. Deste modo, constatou-se que a concentração do solvente no vapor é para todos os casos avaliados inferior à concentração do solvente no líquido.

Pela comparação da mesma mistura com solventes diferentes (20% de solvente) – experiência nº 4-a (Tabela 6) e 4-b (Tabela 7) – podemos visualizar que no primeiro caso, a fase de vapor em equilíbrio é predominantemente composta por solvente (etanol = 95,9%), e que o mesmo não se verifica com o 1,2-propanodiol ($y_{1,2\text{-propanediol}} = 7.6\%$). Estes resultados constituíram o ponto de partida para o desenvolvimento de modelos de aromas.

Tabela 7. Composições no líquido e no vapor em equilíbrio a 23 °C determinadas pelo método UNIFAC na presença de 1,2-propanodiol.

Nº	Fração molar - Líquido				Fração molar – Vapor			
	x_{furfural}	$x_{\text{álc.furfurílico}}$	$x_{\text{butirolactona}}$	$x_{1,2\text{-propa.}}$	y_{furfural}	$y_{\text{álc.furfurílico}}$	$y_{\text{butirolactona}}$	$y_{1,2\text{-propa.}}$
1-b	0.1000	0.4500	0.4500	0.0000	0.1797	0.3009	0.5194	0.0000
2-b	0.4000	0.3000	0.3000	0.0000	0.5258	0.1983	0.2759	0.0000
3-b	0.8000	0.1000	0.1000	0.0000	0.7955	0.1088	0.0956	0.0000
4-b	0.0800	0.3600	0.3600	0.2000	0.1595	0.2494	0.5152	0.0760
5-b	0.3200	0.2400	0.2400	0.2000	0.4998	0.1545	0.2829	0.0628
6-b	0.6400	0.0800	0.0800	0.2000	0.7924	0.0581	0.0871	0.0624
7-b	0.0600	0.2700	0.2700	0.4000	0.1424	0.2252	0.5170	0.1155
8-b	0.2400	0.1800	0.1800	0.4000	0.4719	0.1382	0.2950	0.0950
9-b	0.4800	0.0600	0.0600	0.4000	0.7832	0.0462	0.0886	0.0819
10-b	0.0400	0.1800	0.1800	0.6000	0.1242	0.2092	0.5066	0.1600
11-b	0.1600	0.1200	0.1200	0.6000	0.4331	0.1297	0.3006	0.1365
12-b	0.3200	0.0400	0.0400	0.6000	0.7510	0.0416	0.0907	0.1167

Contudo, não foi possível reproduzir experimentalmente os resultados da Tabela 6 e Tabela 7. De facto, como representado na Figura 6, formam-se subprodutos (TR = 13 e 14 minutos), concluindo-se que estes solventes são desadequados para dissolução das moléculas de 1 a 4, pois, de alguma forma, estas reagem entre si.

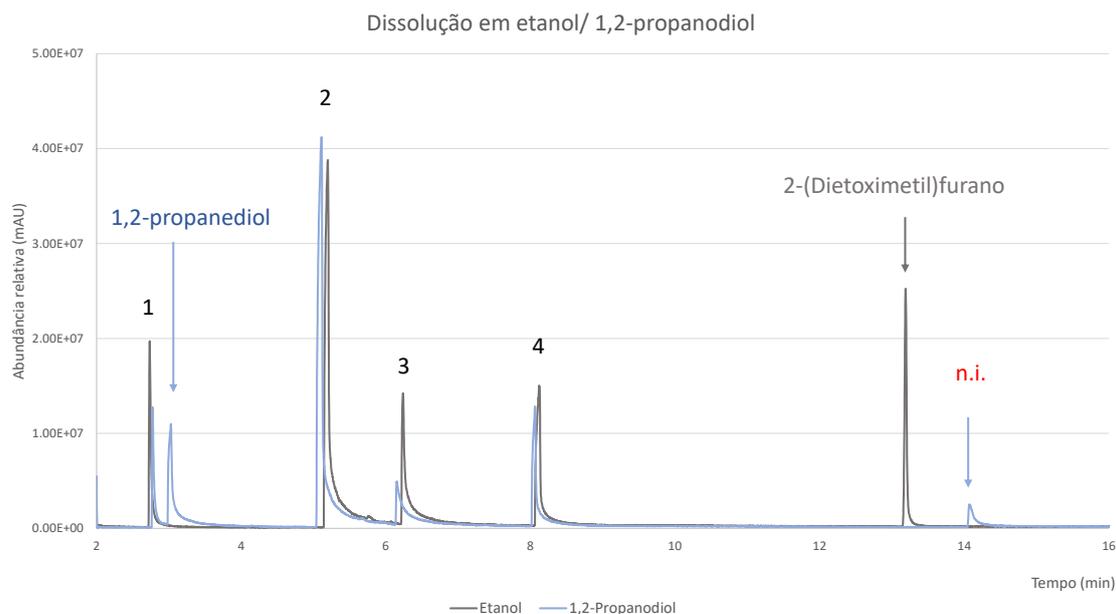


Figura 6. Análise da fase de vapor em equilíbrio das moléculas 1, 2, 3 e 4 em etanol ou 1,2-propanediol; n.i.: não identificado.

Neste sentido, foram considerados solventes de baixa volatilidade, reconhecidos pela sua baixa toxicidade e sem odor, de forma a não interferir no odor final dos aromas “chave” (Tabela 4) como são os solventes glicólicos e o óleo mineral [8, 9]. De realçar que para além da troca do solvente, também foi adicionado uma nova molécula, o álcool isopentílico (3-metilbutan-1-ol), no estudo do equilíbrio líquido-vapor, esta molécula também foi identificada como sendo uma das principais libertadas no processo de cozedura do pão.

De uma forma breve, a análise do VLE com óleo mineral como solvente mostrou-se infrutífero uma vez que é demasiado apolar para o efeito, dando origem a duas fases imiscíveis como apresentado na Figura 7. Assim, os ensaios avançaram com dipropilenoglicol (DPG).



Figura 7. Tentativa de dissolução das moléculas de aroma (Tabela 4) em óleo mineral a diferentes concentrações (A-20%, B-40% e C-95%, percentagens de óleo mineral).

Experimentalmente, foram preparadas diferentes concentrações das principais moléculas libertadas no processo de cozedura do pão junto com o solvente (DPG). Através das regressões lineares obtidas de cada aroma (1 a 4), estimou-se a concentração de cada molécula em mistura, dissolvidas em DPG (Tabela 8). Deste modo, testou-se a reconstituição dos aromas através da quantificação do aroma inicial (aroma analisado na toma de gases do forno) utilizando as concentrações da fase líquida em equilíbrio. Os resultados mais promissores relativos a este tema apresentam-se sumarizados na Tabela 9.

Tabela 8. Quantificação dos compostos maioritários presentes no aroma do pão à saída da toma de gases, estudos da fase líquida.

Identificação		Regressão		Quantificação
Nº	Molécula	Equação	R ²	(g/ g solução)
1	Álcool isopentílico	$y = 8,09 \times 10^8 x - 4,17 \times 10^6$	0,9874	0,0253
2	Furfural	$y = 2,19 \times 10^9 x - 2,51 \times 10^6$	0,9899	0,0575
3	Álcool furfurílico	$y = 3,66 \times 10^8 x - 2,37 \times 10^7$	0,9892	0,4247
4	γ -Butirolactona	$y = 9,03 \times 10^8 x - 1,06 \times 10^7$	0,9774	0,1338

Tabela 9. Frações mássicas da fase líquida (w_i) e composições de vapor em equilíbrio a 23 °C expressas em abundância relativa (% , área).

Identificação		Composição teórica		Testes experimentais			
Nº	Molécula	w_i	%	w_{i_1}	%	w_{i_2}	%
1	Álcool isopentílico	0,0253	4,26	0,0113	5,58 ± 0,47	0,0247	5,30 ± 0,19
2	Furfural	0,0575	32,31	0,0182	44,21 ± 2,25	0,0576	22,27 ± 0,45
3	Álcool furfurílico	0,4247	34,56	0,1408	27,79 ± 2,96	0,4228	52,02 ± 0,12
4	γ -Butirolactona	0,1338	28,87	0,0317	22,41 ± 1,18	0,1345	20,21 ± 0,51

A partir dos resultados mais promissores, foram determinadas as composições na fase de vapor em equilíbrio recorrendo ao método UNIFAC. A Tabela 10 apresenta o VLE para uma concentração molar inicial (x) de solvente de ca. 73 %, sendo que no equilíbrio o componente principal é o álcool furfurílico (56 %) e considerando uma fração molar livre de solvente o valor é de 61% (ensaio w_{i_1}).

Tabela 10. Composições no líquido e no vapor em equilíbrio a 23 °C determinadas pelo método UNIFAC na presença de DPG. Volume total 20 mL, massa inicial total 0.9982 g (Ensaio w_{i_1}).

	DPG	Álcool isopentílico	Furfural	Álcool furfurílico	γ -Butirolactona
x_0 , Fração molar inicial (fase líquida)	0,7371	0,0158	0,0235	0,1790	0,0457
x , Fração molar fase líquida	0,8111	0,0046	0,0100	0,1528	0,0215
y , Fração molar fase vapor	0,0838	0,0534	0,0989	0,5600	0,2039

A Tabela 11 apresenta o VLE para uma concentração inicial (x) de aproximadamente 28% do solvente, e no equilíbrio o componente principal é o álcool furfurílico com cerca de 43%, e considerando uma fração molar livre de solvente o valor é de 43%. Neste caso particular, o cromatograma obtido deste ensaio experimental (ensaio w_{i_2}) reproduz de forma muito similar os resultados obtidos durante o processo de cozedura do pão (Figura 8), na medida em que as três primeiras moléculas seguem o mesmo padrão de abundância relativa comparativamente ao cromatograma do aroma do pão.

Por fim, os resultados alcançados representam um passo fundamental para os estudos de difusão de aromas, uma vez que representam o modelo de aroma característico a pão.

Tabela 11. Composições no líquido e no vapor em equilíbrio a 23 °C determinadas pelo método UNIFAC na presença de DPG. Volume total 20 mL, massa inicial total 1.005 g (Ensaio TesteD4_1).

	DPG	Álcool isopentílico	Furfural	Álcool furfúrico	γ-Butirolactona
x_0 , Fração molar inicial (fase líquida)	0,2846	0,0297	0,0635	0,4566	0,1656
x , Fração molar fase líquida	0,3094	0,0226	0,0541	0,4625	0,1514
y , Fração molar fase vapor	0,0110	0,0872	0,1542	0,4261	0,3215
y , Fração molar fase vapor <i>solvent-free</i>	-	0,0882	0,1560	0,4308	0,3250

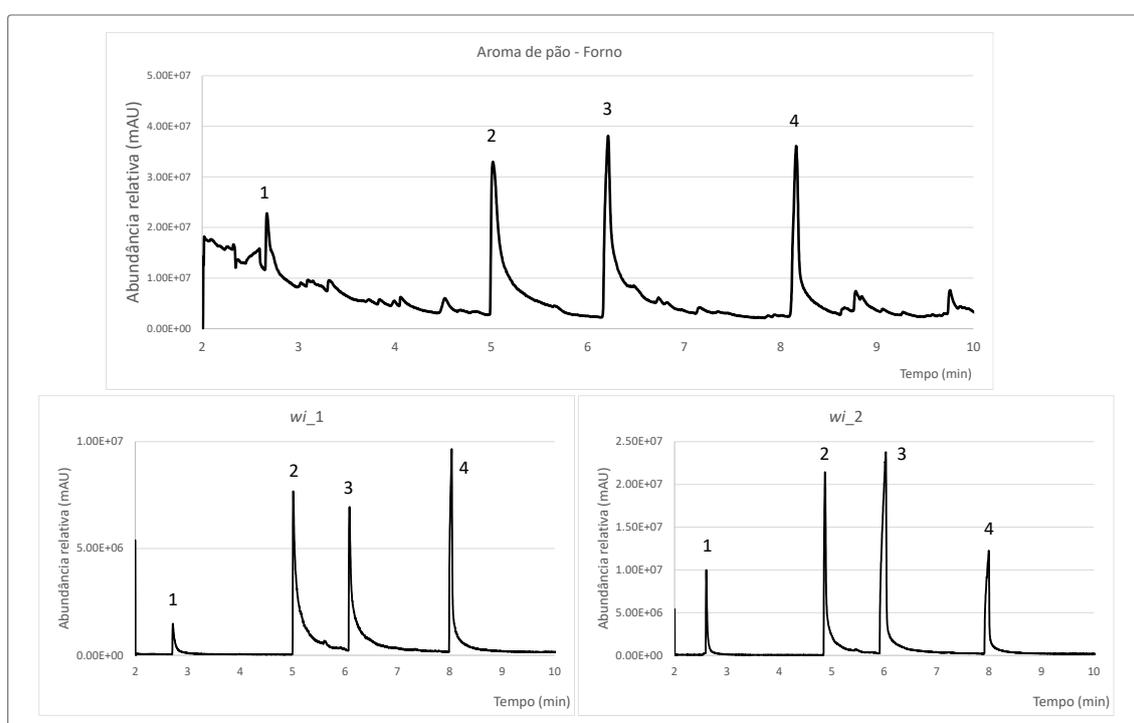


Figura 8. Comparação do perfil em voláteis das reconstituições mais promissoras (wi_1 e wi_2) com o ponto de partida (Aroma de pão - Forno).

Considerando ainda uma fração mássica do solvente (DPG) de 60% na mistura inicial, estimou-se a composição das moléculas libertadas durante a cozedura do pão, que reproduzem a concentração molar na fase vapor de ensaio experimental (ensaio wi_1). A Tabela 12 mostra o resultado obtido com um desvio < 15 %.

Tabela 12. VLE a 23 °C considerando o método UNIFAC. Volume total 20 mL, massa inicial total 1.000 g.

	DPG	álcool isopentílico	Furfural	Álcool furfurílico	γ - butirolactona
x0, Fração molar inicial (fase líquida)	0,5138	0,0276	0,0430	0,2998	0,1158
x, Fração molar fase líquida	0,5625	0,0181	0,0323	0,2936	0,0934
y, Fração molar fase vapor	0,0257	0,0931	0,1330	0,4186	0,3296
y, Fração molar fase vapor <i>solvent-free</i>	-	0,0956	0,1365	0,4296	0,3383

Referências

- [1] Gomes, P. B., Mata, V.G., Rodrigues, A. E. (2008). Experimental validation of perfumery ternary diagram methodology. *AICHE Journal*, 54, 310-320.
- [2] Gonçalves, D., Costa, P., Rodrigues, C.E.C., Rodrigues, A.E. (2017). Fractionation of acid lime essential oil using ethanol/water mixtures: effect of the process on the aroma profile. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 108, 118-126.
- [3] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 7302, gamma-Butyrolactone. Retrieved July 12, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gamma-Butyrolactone>.
- [4] Gemert, L.J. (2011). Odour thresholds – Compilations of odour thresholds values in air, water and other media. 2nd edition. Published by Oliemans Punter & Partners, The Netherlands.
- [5] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 7302, gamma-Butyrolactone. Retrieved July 12, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gamma-Butyrolactone>.
- [6] Teixeira, M.A., Rodríguez, O., Mota, F.L., Macedo, E.A., Rodrigues, A.E. (2011). Evaluation of Group-Contribution Methods To Predict VLE and Odor Intensity of Fragrances. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50, 9390–9402
- [7] Negadi, L., Mokbel, I., Chiali-Baba-Ahmed, N., Kara-Zaitri, L. (2014). Phase equilibrium properties of binary mixtures containing 2,5-dimethylfuran and furfuryl alcohol or methyl isobutyl ketone at several temperatures. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 70 233–238.
- [8] Hooth, M. J., Herbert, R. A., Haseman, J. K., Orzech, D. P., Johnson, J. D., Bucher, J. R. (2004). Toxicology and carcinogenesis studies of dipropylene glycol in rats and mice. *Toxicology*, 204, 123-140.
- [9] Costa, P., Teixeira, M. A., Mestre, G., Carneiro, L., Loureiro, J. M., Rodrigues, A.E. (2017). Predicting Vapor-Phase Concentrations for the Assessment of the Odor Perception of Fragrance Chemicals Diluted in Mineral Oil. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56, 8767-8777.

Anexo

A. Procedimento de preparação do saco de amostragem

1. Colocar 4 mL de fragância num frasco de 20 mL;
2. Fechar o frasco com tampa de *Headspace* (HS) com o encapsulador;
3. Deixar em repouso a temperatura ambiente (25 °C) durante 20 h;
4. Encher parcialmente os sacos de amostra com ar comprimido e tapar com o *stopper*;
5. Picar o septo da tampa de HS com uma agulha antiga (para não partir a agulha da seringa de *gastight*);
6. Usar uma seringa de *gastight* de 10 mL para tirar o volume de gás de aroma desejado;
7. Colocar o volume de amostra dentro do saco parcialmente cheio e tapar imediatamente. Este passo é repetido de acordo com o volume desejado a injetar;
8. Perfazer o volume do saco de amostra com o ar comprimido de forma a ficar totalmente cheio e colocar imediatamente o *stopper*;
9. Deixar estabilizar o saco durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C) para atingir o equilíbrio;
10. Lavar a seringa utilizada com solvente adequado (etanol ou hexano dependendo da polaridade da fragância);
11. Retirar a tampa de HS do frasco utilizando uma pinça para a conseguir remover;
12. Volume de amostra líquida de fragância para o lixo de orgânicos;
13. Lavar os frascos com detergente e passar no banho de ultrassons durante 15 min pelo menos 2x.

Anexo

B. Protocolo de utilização do Olfatómetro TO7

1. Abrir a garrafa de ar comprimido (manómetro vai indicar a pressão da garrafa);
2. Confirmar se o tubo está ligado ao olfatómetro;
3. Abrir o segundo manómetro (reductor de pressão-1) em 4 bar (pressão só pode variar entre 3-5 bar);



Figura B9: Garrafa de ar comprimido. O regulador (1) regula a pressão, que entra no olfatómetro através do tubo branco visível nas imagens (setas).

4. Verificar se o cabo RS232C está conectado entre o olfatómetro e o computador;

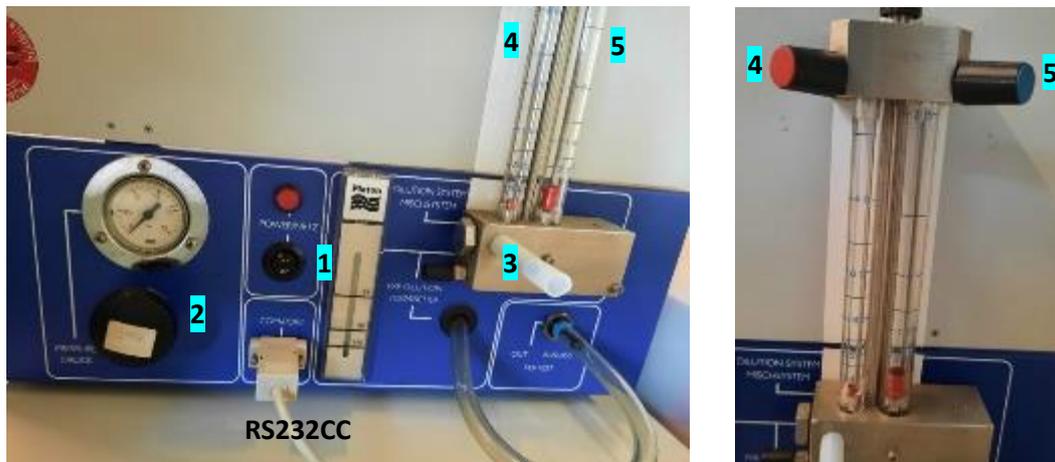


Figura B10: Painel do olfatómetro. Zoom nas válvulas vermelha e azul para controlo das diluições. Vermelha: 640-40 e azul: 20-2.5.

5. Ligar o olfatómetro no botão ON/OFF (Figura B2 - 1);
6. Abrir o software: Atalho para T07 (aparece janela: *starting check*);
7. *Main Menu*: Selecionar o botão *Check*;
 - 7.1 Abrir ligeiramente a válvula que regula a pressão no olfatómetro (Figura B2 - 2)
 - 7.2 *Olfactometer test* selecionar *Open* no separador *Main valve* (passo para ajustar a pressão e verificar o funcionamento das válvulas). Não exceder os 2 bar (normalmente é usado 1.5 bar ou 1.9 bar).

Anexo

7.3 Caso sejam usadas as pré-diluições do olfatômetro será necessário verificar *Pre-dilution valve* carregando no *open* do software. **ATENÇÃO:** este passo será abordado à posteriori.

7.4 Após verificação selecionar *OK*, e a janela fecha-se.

8. Selecionar *Odour trheshold determination* para definir as condições e parâmetros do ensaio;

8.1 Separador *Method of measurement*

8.1.1 Selecionar *method of limits* (y/n). Por defeito é a única opção permitida.

8.2 Separador *Olfactometer*

8.2.1 *Panelists* - Preencher o número de painelistas

8.2.2 *Mesuring sequences* – Para o máximo de painelistas (4) o número de sequências ideais são 3. Caso o número de painelistas seja inferior a 4 (p.ex.: 3) o número de sequências deve ser aumentado para diminuir o erro.

8.2.3 *Breathing time* (milisec) – 2200 (valor standard)

8.2.4 *Flushing time* (sec) – 5 (valor usual). Para amostras mais intensa aumentar o valor de *flushing*.

8.2.5 *Percentage of accidental blanks* – 20% é o valor recomendado pela norma VDI3881. No entanto este valor pode ir até 50%.

8.3 Separador *Panelists*

8.3.1 Preencher o nome do *test leader* (pessoa que orienta o ensaio);

8.3.2 Preencher a abreviação do nome de cada painalista (pessoas que realizam o teste no olfatômetro);

8.4 Separador *Pre-dilution device*

8.4.1 O equipamento faz automaticamente as pré-diluições de 25, 50 e 100 que tem de ser preenchidas na barra de *Pre-dilution ratio* de acordo com a diluição pretendida. No entanto, é comum não usar as pré-diluições do olfatômetro. Neste caso o botão deve ficar a 0 (no *pre-dilution*).

8.5 Separador *Sample*

8.5.1 *Name of measurment cycle* – Colocar o nome do ensaio

8.5.2 *Name of the sample* - Colocar o nome da amostra

8.5.3 *Concentration* – Preencher com a concentração de aroma no saco.

8.5.4 *Sample pre-dilution* – Colocar o valor de **1** se não for para realizar a pré-diluição do olfatômetro. Caso seja para usar as pré-diluições o valor a colocar tem de ser **0**.

8.5.5 *Start step* – Selecionar o valor da diluição pelo qual o ensaio começa. Este passo é escolhido pelo *test leader* de acordo com algum conhecimento prévio. Estas diluições vão de 640 a 2.5.

Anexo

- 8.6 Colocar o saco da amostra no olfatômetro. No mínimo de tempo possível, tirar o *stopper* do tubo PTFE e fazer a ligação ao tubo do olfatômetro (Figura 2 - 3).
- 8.7 Carregar em *Continue*
- 8.8 Aparece a mensagem: *Flush in the sample – open the valves briefly*. Abrir ligeiramente a válvula vermelha (Figura2 - 4). Carregar em *OK*.
- 8.9 O software liga automaticamente as válvulas. Ajustar para a diluição 80, deixar cerca de 2 segundos para garantir a saída de *sample air* ao mesmo tempo nos *sniffers*.
- 8.10 Aparece a mensagem: *OK to continue*. Carregar em *OK*.
- 8.11 As válvulas fecham-se. E aparece a mensagem: *Start measuring sequence*. Carregar em *OK*.
- 8.12 Ouvem-se 3 sinais sonoros.
- 8.13 Ajustar a válvula para a diluição inicial definida no *start step*.
- 8.14 O primeiro sniff é sempre ar de referência (corresponde à diluição **0** e à cor cinzenta do software)
- 8.15 Seguidamente é necessário ajustar a diluição nas agulhas (vermelha e azul) a cada diluição que o software indicar. **NOTA:** Na passagem da diluição de 40 para 20 é obrigatório fechar rapidamente a agulha vermelha (Figura2 - 4) e abrir a agulha azul (Figura2 - 5) em 20. É de lembrar que o teste continua a correr normalmente.
- 8.16 Quando há 2 respostas afirmativas para diluições consecutivas a sequência é terminada pelo software. O número de sequências é definido no início (passo 8.2.2). Caso não haja respostas afirmativas o software repete automaticamente a sequência.
- 8.17 Quando o número de sequência é completado com sucesso, a aparece a matriz com os resultados. Neste momento deve-se guardar os dados fazendo *print screen* da imagem. **NOTA:** o botão *Save* exporta em formato *Excel* mas os valores não ficam reportados.
- 8.18 Carregar no botão *OK*.
- 8.19 Aparece a mensagem: *Open valves*. Abrir as agulhas vermelha e azul para fazer o *flushing*. Carregar *OK*. O sistema para automaticamente.
- 8.20 Fechar todas as válvulas (agulha vermelha e azul) e manómetro do olfatômetro.
- 8.21 Desligar o equipamento no botão *ON/OFF*.
- 8.22 Fechar o segundo manómetro da garrafa de ar comprimido. Despressurizar o olfatômetro tirando o tubo na ligação, com cuidado.
- 8.23 Fechar a garrafa de ar comprimido.

Anexo

C. Ficha técnica para registo dos resultados do olfatómetro

DATASHEET – THRESHOLD – OLFATOMETER

Assay: _____ Date: _____

MOLECULE INFORMATION

Name: _____ CAS №.: _____

Vapour pressure (Pa): _____ - Source: Calculated / Online library

HEADSPACE (HS) INFORMATION

Liquid compound (mL): _____ Vial volume (mL): _____ Number of vials: _____

Equilibrium (h): _____

SAMPLE BAG PREPARATION

Bag number: _____ Bag volume (L): _____ Aroma gas volume (mL): _____

Concentration of aroma in the bag (mg/m³): _____

PANELISTS INFORMATION

P1: Name: _____ Age: _____ Sex: _____

P2: Name: _____ Age: _____ Sex: _____

P3: Name: _____ Age: _____ Sex: _____

P4: Name: _____ Age: _____ Sex: _____

RESULTS – THRESHOLD

Pre-dilution: _____ Blanks (%): _____ Z50 (OU/m³): _____ Z16 (OU/m³): _____

Z84 (OU/m³): _____ Z11 (OU/m³): _____ Z1 (OU/m³): _____

	Start step	P1	P2	P3	P4
Sequence1					
Sequence2					
Sequence3					
Error 1	---				
Error 2	---				
Error 3	---				