PLANEJAMENTO FATORIAL E METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA AVALIAR OS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE QUEIJO COLONIAL ARTESANAL

Fabiane Andresa Oliveira-Pereira[a], Fabiane Picinin Castro-Cislaghi[b], Alessandra Machado-Lunkes[a,c]*, Silvane Morés[c]

a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

b Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias

c Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento Acadêmico de Química e Ciências Biológicas, Francisco Beltrão/PR-Brasil

*__Autor de correspondência:__ Alessandra Machado-Lunkes, UTFPR, Linha Santa Bárbara, s/n, CEP 85601-970, Caixa Postal 135, Francisco Beltrão/PR. Telefone: +55 (46) 3520-2610, e-mail: amachado@utfpr.edu.br, ORCID: 0000-0002-7258-9905

RESUMO

O objetivo foi determinar as condições de aplicação da HS-SPME para análise dos compostos voláteis em queijo Colonial artesanal do Sudoeste do Paraná. Os parâmetros (tempo de equilíbrio, tempo de exposição da fibra ao *headspace* e efeito *salting-out*) que afetam a eficiência da extração dos compostos voláteis foram avaliados usando um planejamento fatorial em dois níveis e o método de superfície de resposta. Em média um total de 18 compostos voláteis foram obtidos. As condições ideais de extração ocorreram em tempo de equilíbrio de 10 minutos, tempo de exposição da fibra ao *headspace* de 15 minutos e não houve a necessidade do emprego de NaCl na extração.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa, Microextração em fase sólida, Gráfico de Pareto, Queijo Colonial.

1. INTRODUÇÃO

O Queijo Colonial, originalmente fabricado por imigrantes europeus, é um produto artesanal elaborado com leite cru, é muito apreciado nos Estados do Sul do país, por ser um produto típico desta região (Carvalho, Linder & Farinã, 2015). Diversos estudos sobre a valorização de queijos artesanais regionais foram realizados em âmbito nacional, abrangendo aspectos relacionados ao reconhecimento local e sociais do queijo Minas artesanal do Serro (Medeiros, Terra & Passado, 2019), ou o desenvolvimento territorial e valorização do saber-fazer no queijo de coalho artesanal no Ceará (Bezerra et al., 2016). Ainda, para o caso do queijo Serrano, os estudos evidenciaram a importância da valorização e proteção do saber fazer de modo artesanal com a consequente manutenção da tradição (Cruz & Menasche, 2014), e o queijo Minas artesanal da Canastra, onde o processo de indicação de procedência buscou valorizar o conhecimento tácito dos produtores (Matos & Rovere, 2018). Ao destacar as particularidades dos queijos artesanais de cada região, vale realçar a importância de atributos que caracterizam aquele alimento como único. Os compostos voláteis e perfil de ácidos graxos são exemplos desses atributos (Sant'Ana et al., 2018).

O odor é um atributo sensorial muito importante para queijos, sendo que este é o resultado de um equilíbrio complexo entre compostos químicos voláteis, gerados durante o processamento, maturação e/ou armazenamento. A classificação e a concentração desses compostos são usadas para caracterizar queijos e configurar parâmetros de qualidade (Sandoval-Copado et al., 2018).

Neste contexto, diferentes técnicas são usadas na extração dos compostos voláteis cujas estratégias estão relacionadas ao acondicionamento da amostra (câmara de amostragem, frasco, aspersor de vidro em forma de U), princípio de operação

(frasco sob vácuo, barra de agitação magnética recoberta, gás inerte purgado em câmara de amostragem, seringa com agulha recoberta) e *trapping technology* (Bertuzzi et al., 2018). A técnica de microextração em fase sólida no *headspace* (HS-SPME) é, dentre as técnicas de extração, a mais utilizada para caracterizar os compostos voláteis em alimentos e bebidas (Fernandes et al., 2018; Matera et al., 2018) e esta abordagem também tem sido aplicada nos queijos artesanais (Bezerra et al., 2016; Sant'Ana et al., 2019).

Os compostos voláteis são como a impressão digital do produto, servem para identificar as particularidades do alimento, podendo até demonstrar como a alimentação do animal influencia no produto produzido (Bozoudi et al., 2018). Entretanto para a sua efetiva extração se faz necessário otimizar os parâmetros mais importantes que afetam o método HS-SPME, tais como, tipos de fibra empregada, temperatura de extração, tempo de exposição da fibra ao *headspace*, concentração de sal e volume de amostra (Januszkiewicz et al., 2008). De fato, o método está baseado no equilíbrio entre a matriz da amostra e o recobrimento da fibra que quando atingido promove a extração completa dos compostos voláteis. A taxa de extração e a sensibilidade do processo de extração serão eficientes e reprodutíveis mediante otimização da dinâmica do processo de sorção dos voláteis pela fibra (Ma et al., 2013).

Em vista disso, o objetivo foi otimizar a extração de compostos voláteis de queijo Colonial artesanal usando HS-SPME e cromatografia gasosa, e determinar os melhores parâmetros de extração usando planejamento fatorial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

O queijo Colonial foi elaborado artesanalmente com leite cru, em queijaria situada na Região Sudoeste do Paraná e maturado sob refrigeração durante 240 dias. A produção em pequena escala e maturação do queijo aconteceu seguindo a cultura local (Castro-Cislaghi & Badaró, 2019). Amostras de queijo Colonial artesanal foram armazenadas congeladas (-18 °C) em embalagem a vácuo até o momento da análise. Foram retirados e descartados 0,5 cm da casca e a parte interna do queijo de três amostras independentes foi ralada em pedaços finos.

2.2 Condições de extração dos compostos voláteis

As condições de extração utilizadas foram selecionadas com base em estudos realizados previamente (Morés, 2009). A otimização da extração foi realizada através de planejamento fatorial completo em dois níveis com inclusão de duas replicatas no ponto central, totalizando 16 experimentos. As variáveis independentes efeito *salting-out* (X_1), tempo de equilíbrio (X_2) e tempo de exposição da fibra ao *headspace* (X_3) foram analisadas. As variáveis respostas foram a soma das áreas dos picos totais (Y1) e dos picos majoritários dos compostos voláteis (Y2).

2.3 Análise HS-SPME

As condições de extração dos compostos voláteis foram adaptadas segundo método descrito por Lee et al., (2003). Cinco gramas de queijo Colonial artesanal foram dispostos em um frasco de 40 mL (Supelco, Taufkirchen, Alemanha) com a quantidade de NaCl determinada para o experimento e 15 mL de água destilada. O frasco foi selado com septo de silicone e a amostra foi submetida à agitação magnética

em temperatura ambiente (25 °C), conforme o tempo de equilíbrio definido no planejamento fatorial (Tabela 1). Em seguida, a fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno / Carboxen / Polidimetilsiloxano) (Supelco, Taufkirchen, Alemanha) foi introduzida no frasco e exposta ao *headspace* da amostra pelo tempo de exposição da fibra ao *headspace* determinado para o experimento (Tabela 1). Após o tempo necessário de extração, os voláteis foram dessorvidos termicamente no injetor do cromatógrafo a gás (CG). As análises cromatográficas foram realizadas em um CG (Shimadzu GC-2014, Kyoto, Japão) com injetor no modo *splitless* e detector por ionização em chama (FID). A coluna capilar utilizada foi a Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm) (Restec, Bellefonte, Estados Unidos). Gás hélio (White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado como carreador com vazão de 1,0 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 250 °C e 280 °C, respectivamente. O programa de temperatura do forno foi: 40 °C por 2 min, aumento de 6 °C/min até atingir 160 °C e aumento de 10 °C/min até atingir 210 °C. As áreas (≥ 10000) dos picos foram usadas como variável resposta para o planejamento fatorial.

2.4 Análise estatística

Os principais efeitos, bem como as interações entre as variáveis, foram avaliados usando o gráfico de Pareto no intervalo de confiança de 95% ($p = 0,05$). A superfície de resposta foi utilizada para determinar a condição adequada para a extração dos voláteis ($p < 0,05$). Todos os resultados foram processados no *software* Statistica 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc., Tulsa, Estados Unidos).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A área dos picos cromatográficos de cada experimento foi usada como variável resposta (Tabela 1). Assim, quanto maior a área total de picos, maior o número e concentração de compostos retidos na fibra o que possibilita a otimização dos parâmetros de extração dos voláteis (Bezerra et al., 2016).

Tabela 1 – Planejamento fatorial das condições de extração de compostos voláteis e respostas experimentais em queijo Colonial artesanal

	Variáveis independentes			**Respostas**	
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
Ensaio	NaCl (%)[a]	Equilíbrio (min.)[a]	Extração[d] (min.)[a]	Soma das áreas de todos os picos[b]	Soma das áreas dos picos majoritários[c]
1	- (5)	- (5)	- (5)	1459190	583193
2	- (5)	- (5)	+ (15)	1335292	1028685
3	- (5)	+ (15)	- (5)	446059	411255
4	- (5)	+ (15)	+ (15)	1421824	1234967
5	+ (25)	- (5)	- (5)	420908	420908
6	+ (25)	- (5)	+ (15)	1238666	992572
7	+ (25)	+ (15)	- (5)	791787	679449
8	+ (25)	+ (15)	+ (15)	1336301	1235086
9	- (5)	0 (10)	0 (10)	1178065	1077318
10	+ (25)	0 (10)	0 (10)	1281915	1100999
11	0 (15)	- (5)	0 (10)	486989	403976
12	0 (15)	+ (15)	0 (10)	726695	680992
13	0 (15)	0 (10)	- (5)	386547	386547
14	0 (15)	0 (10)	+ (15)	1714225	1603175
15 (C)	0 (15)	0 (10)	0 (10)	760656	749954
16 (C)	0 (15)	0 (10)	0 (10)	633928	611285

[a]Níveis codificados reais.

[b]Soma das áreas de todos os picos que aparecem no cromatograma e que apresentam área igual ou maior a 10000.

[c]Soma das áreas dos picos que aparecem em pelo menos metade dos experimentos e que apresentam área igual ou maior a 10000 (picos majoritários).

[d]exposição da fibra ao *headspace*

Na Figura 1, é possível analisar o gráfico de Pareto (R^2 = 0,81648) gerado para a soma das áreas de todos os picos que aparecem no cromatograma de cada experimento. Nesse gráfico, percebe-se que nenhuma das variáveis (porcentagem de NaCl, tempo de equilíbrio e tempo de extração (exposição da fibra ao *headspace*) foram significativas (p = 0,05). Portanto, para os intervalos selecionados neste estudo, os resultados são indiferentes às variáveis avaliadas. Assim, decidiu-se por uma nova avaliação, utilizando como variável dependente, ao invés da soma das áreas de todos os picos, a soma das áreas de todos os picos majoritários.

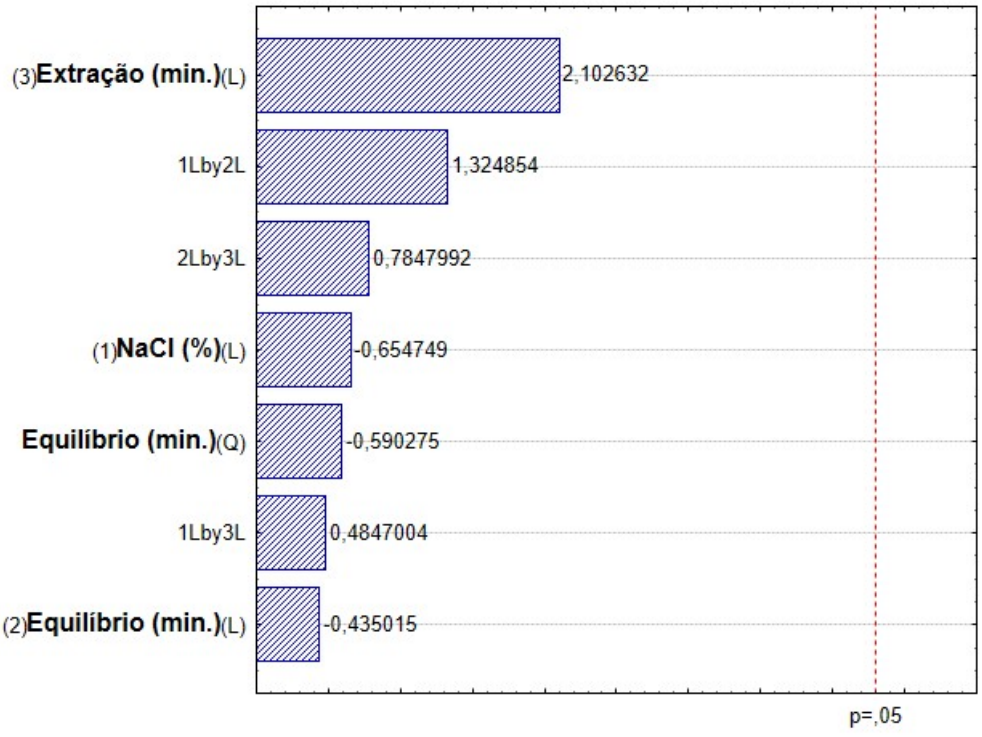

Figura 1 – Gráfico de Pareto para área dos picos totais

Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial em dois níveis. Os efeitos que ultrapassam a linha de *p* = 0,05 são estatisticamente significativos sobre a resposta analítica com 95% de confiança

Os resultados obtidos com o planejamento fatorial expressos pelo gráfico de Pareto para a soma das áreas de todos os picos majoritários estão apresentados na Figura 2 (R^2 = 0,87858). A única variável significativa é o tempo de extração (exposição da fibra ao *headspace*) (p = 0,05). Com isso, percebe-se que quanto maior for o tempo de exposição da fibra ao *headspace*, melhor será a resposta.

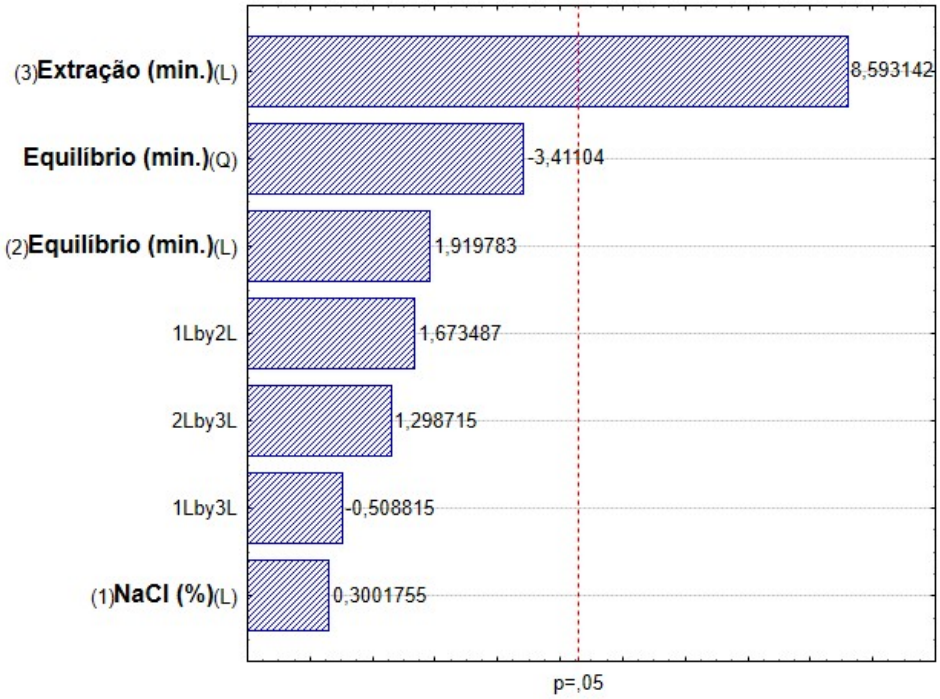

Figura 2 – Gráfico de Pareto para área dos picos majoritários

Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial em dois níveis. Os efeitos que ultrapassam a linha de *p* = 0,05 são estatisticamente significativos sobre a resposta analítica com 95% de confiança

Baseado na superfície de resposta, quando se analisa a relação entre porcentagem de NaCl e tempo de exposição da fibra ao *headspace* (Figura 3a), é observado que independentemente da porcentagem de NaCl, quanto maior o tempo

de exposição, maior será a soma das áreas dos picos. Também é perceptível que quando a porcentagem de NaCl é menor, obtém-se melhores resultados.

Já pela relação entre tempo de equilíbrio e tempo de exposição da fibra ao *headspace* (Figura 3b), nota-se que em um tempo de equilíbrio médio, por volta dos 10 minutos e um tempo de exposição da fibra ao *headspace* acima de 15 minutos, obtêm-se melhores resultados em termos de área de pico.

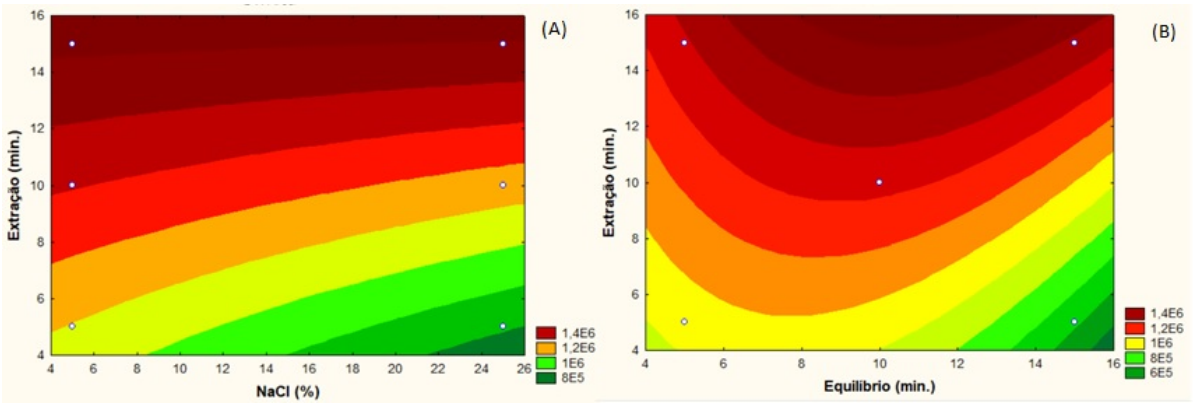

Figura 3 – Superfície de resposta para área dos picos totais

Na Figura 4a percebe-se que a superfície de resposta para os picos majoritários, que a região com os melhores valores de resposta está localizada quando o tempo de equilíbrio médio de 10 minutos e a porcentagem de NaCl é indiferente.

Na relação entre porcentagem de NaCl e tempo de exposição da fibra ao *headspace* (Figura 4b), é observado que independentemente da porcentagem de NaCl, quanto maior o tempo de exposição da fibra ao *headspace*, maior será a soma das áreas dos picos.

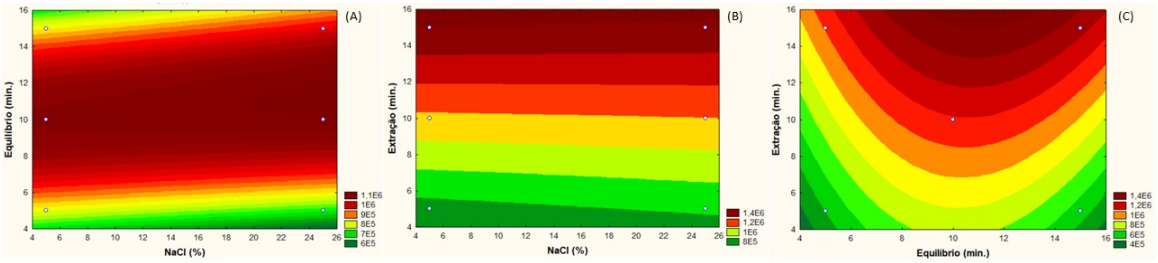

Figura 4 – Superfície de resposta para área dos picos majoritários

Já pela relação entre tempo de equilíbrio e tempo de exposição da fibra ao *headspace* (Figura 4c), nota-se que em um tempo de equilíbrio médio, por volta dos 10 minutos e um tempo de exposição da fibra ao *headspace* acima de 15 minutos, obtêm-se os melhores resultados em termos de picos majoritários.

Portanto, tanto na análise pelo gráfico de Pareto e pelo perfil da superfície de resposta, o efeito *salting-out* (uso de NaCl) não apresentou os resultados esperados, sendo que é desnecessário seu uso, contrariamente ao observado em outros estudos para a fibra apolar (CAR/PDMS) cuja presença aumentou a sensibilidade (Januszkiewicz et al., 2008; Lee et al., 2003). O tempo de equilíbrio médio e um maior tempo de exposição da fibra ao *headspace* indicam os melhores resultados, semelhantemente ao observado para o queijo Oaxaca (Sandoval-Copado et al., 2018).

4. CONCLUSÕES

Na análise de compostos voláteis de queijo Colonial artesanal do Sudoeste do Paraná por GC-HS-SPME, constatou-se que o efeito *salting-out* não é significativo e, portanto, não é necessário o uso de NaCl durante a etapa de extração dos compostos voláteis do queijo no *headspace*. Também foi evidenciado que o tempo de equilíbrio médio, antes da exposição da fibra, pode ser de 10 minutos. Ainda, que um tempo

médio de 15 minutos de exposição da fibra DVB/CAR/PDMS ao *headspace* é o suficiente para a extração dos compostos voláteis. Esses parâmetros podem ser adotados tanto na análise de todos os compostos, quanto na análise apenas dos compostos majoritários da amostra de queijo Colonial.

5. Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do CNPq (424180/2018-9).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bertuzzi, A. S., McSweeney, P. L. H., Rea, M. C., & Kilcawley, K. N. (2018) Detection of volatile compounds of cheese and their contribution to the flavor profile of surface-ripened cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 371-390.

Bezerra, T. K. A., Araújo, A. R. R., Arcanjo, N. M. O., Silva, F. L. H., Queiroga, R. C. R. E., & Madruga, M. S. (2016). Optimization of the HS-SPME-GC/MS technique for the analysis of volatile compounds in caprine Coalho cheese using response surface methodology. Food Science and Technology, 36: 103-110.

Bozoudi, D., Kondyli E., Claps, S., Hatzikamari, M., Michaelidou, A., Biliaderis, C. G., & Litopouloutzanetaki, E. (2018). Compositional characteristics and volatile organic compounds of traditional PDO Feta cheese made in two different mountainous areas of Greece. *International Journal of Dairy Technology,* 71: 1-10.

Carvalho, M. M. Londer, J. D. & Farinã, L. O. (2015) A produção de queijo Colonial artesanal no município de Seara, Estado de Santa Catarina, frente à legislação brasileira. *Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 70: 253-261.

Castro-Cislaghi, F. P., & Badaró, A. C. L. (Eds.). (2019). *Segurança alimentar na produção de queijos: queijo colonial artesanal* (Vol. 1). Francisco Beltrão-PR: Grafisul.

Cruz, F. T. & Menasche, R. (2014). O debate em torno de queijos feitos de leite cru: entre aspectos normativos e a valorização da produção tradicional. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência e Tecnologia,* 2: 34-42.

Fernandes, N. C. M., Gomes, F. C. O., Garcia, C. F., Vieira, M. L. A., & Machado, A. M. R. (2018). Use of solid phase microextraction to identify volatile organic compounds in brazilian wines from diferente grape varieties. *Brazilian Journal of Food Technology,* 21: 1-9.

Januszkiewicz, J., Sabik, H., Azarnia, S., & Lee B. (2008). Optimization of headspace solid-phase microextraction for the analysis of specific flavors in enzyme modified and natural Cheddar cheese using factorial design and response surface methodology. *Journal of Chromatography A*, 1195: 16-24.

Lee, J. H., Diono, R., Kim, G. Y., & Min, D. B. (2003). Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of Parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1136-1140.

Ma, Q. L., Hamid, N., Bekhit, A. E. D., Robertson, J., & Law, T. F. (2013). Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology. *Microchemical Journal,* 111: 16-34.

Matera, J., Luna, A. S., Batista, D. B., Pimentel, T. C., Moraes, J., Kamimura, B. A., Ferreira, M. V. S., Silva, H. L. A., Mathias, S. P., Esmerino. E. A., Freitas, M. Q., Raices, R. S. L., Quitério, S. L., Sant'Ana, A. S., Silva, M. C. & Cruz, A. G. (2018). Brazilian cheeses: A survey 1064 covering physicochemical characteristics, mineral contente, fatty acid profile and 1065 volatile compounds. *Food Research International* 108: 18-26.

Matos, L. A. I & Rovere, R. L. L. (2018). Conceitos dos irmãos Polanyi como ferramentas de análise de indicações geográficas: o caso da indicação de procedência do Queijo Minas artesanal da região da Canastra/MG. *Revista Econômica do Nordeste*, 49: 133-148.

Mederiros, M. L., Terra, L. A. A. & Passador, J. L. (2019) Geographical indications and territorial development: A soft-system methodology analysis of the Serro Case. *Systems Research and Behavioral Science*, 36: 1-15.

Morés, S. (2009). Determinação de compostos voláteis em cachaça por microextração em fase sólida (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Sandoval-Copado, J. R., Orozco-Villafuerte, J., García-Fabila, M. M., & Colín-Cruz, M. A. (2018). Optimization of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry technique for the quantification of volatile compounds in a fresh cheese (Oaxaca). *Journal of Chromatography and Separation Techniques*, 9: 1-7.

Sant'Ana, A. M. S., Bessa, R. J. B., Alves, S. P., Medeiros, A. N., Costa, R. G., Malveira Batista, A. S., Madruga, M. S., & Queiroga, R. C. R. E. (2019). Fatty acid, volatile and sensory profiles of milk and cheese from goats raised on native semiarid pasture or in confinement, *International Dairy Journal*, 91: 147-154.