

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Catarina Seixas Lopes

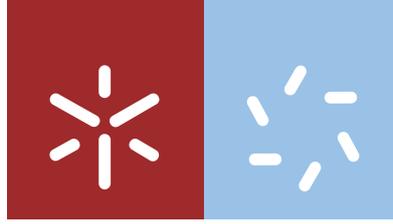
**Estudo de maceração de perfumes  
e produtos perfumados**

Estudo de maceração de perfumes e produtos perfumados

Catarina Seixas Lopes

UMinho | 2019

julho de 2019



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Catarina Seixas Lopes

## **Estudo de maceração de perfumes e produtos perfumados**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho realizado sob orientação da  
**Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Paula Almada Faria Bettencourt Estevão**  
e da  
**Doutora Daniela Matilde Marques Correia**

## DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO POR UM PERÍODO DE 20 ANOS.

# Agradecimentos

Com a conclusão desta dissertação, resta-me agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste projeto.

Primeiramente gostaria de manifestar o meu reconhecimento à Professora Doutora Ana Paula Bettencourt que prontamente se disponibilizou para me orientar, e cujo parecer foi fundamental no desenvolvimento da dissertação.

Um agradecimento especial à Doutora Daniela Correia, que me orientou ao longo de todo o período de estágio. Por todos os conhecimentos transmitidos, pelo carinho, amabilidade e disponibilidade, o meu sincero obrigado.

Agradeço ainda ao Daniel Vilaça, CEO da Nortempresa, que me proporcionou a oportunidade de estágio, disponibilizando as melhores condições para o desenvolver. Sem esquecer todos os colaboradores da Nortempresa que me integraram na equipa e cuja boa disposição tornou esta experiência ainda mais recompensadora.

## Declaração de Integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

# Estudo de maceração de perfumes e produtos perfumados

## Resumo

A arte da perfumaria conta com milhares de anos de história, e cuja constante evolução nos presenteou com perfumes como atualmente os conhecemos. Cada fragrância é uma mistura única de ingredientes, que em harmonia transmitem diferentes emoções a cada indivíduo. O progresso científico que se fez sentir nas últimas décadas tornou o que outrora era exclusivo a elementos da alta sociedade, num produto acessível a grande parte da população.

Nos dias que correm, a perfumaria é uma indústria de extrema competitividade e como tal, surge uma necessidade de contínua inovação na otimização dos processos de fabrico, nunca descurando as crescentes exigências relativas ao controlo de qualidade. Neste âmbito, a presente dissertação abordou aspetos pertinentes tanto ao nível do desenvolvimento de produto como do controlo de qualidade. Assim, foi monitorizada a maceração de oito perfumes, com o objetivo de avaliar a possibilidade de reduzir o tempo associado a este processo. Foi ainda estudada a estabilidade do produto acabado ao longo do tempo, realizando-se ensaios de estabilidade preliminar, acelerada e testes de prateleira.

Relativamente aos ensaios de estabilidade, os principais objetivos foram estimar prazos de validade para os perfumes em estudo, assim como estabelecer limites máximos de aceitação do produto, no que diz respeito aos parâmetros físico-químicos avaliados. De modo a complementar o controlo de qualidade do produto acabado, foram estudadas as alterações químicas que ocorrem aquando da oxidação de um perfume, para isso foram obtidos espectros de GC-MS de amostras oxidadas e comparadas com espectros de amostras não oxidadas. Estas análises foram reveladoras, permitindo identificar um composto comum às fragrâncias oxidadas, o acetaldeído dietil acetal, assim como o desaparecimento de compostos fundamentais às fragrâncias sob estudo.

Por fim, os estudos de maceração realizados mostraram-se bastante promissores, observando-se o equilíbrio químico duas semanas após a produção do perfume e consequentemente, sugerindo a possibilidade de redução do tempo de maceração de 5 dos 8 perfumes estudados em uma semana relativamente ao protocolo implementado atualmente pela Nortempresa.

**Palavras-chave:** estabilidade, GC-MS, maceração, perfume

# Study of perfume and perfumed product maceration

## Abstract

The art of perfumery has thousands of years of history, and its constant evolution has presented us with perfumes as we currently know them. Each fragrance is a unique blend of ingredients that, in perfect harmony, convey different emotions to each individual. The scientific progress that has been made in the last decades has allowed what was once exclusive to members of high society, to become accessible to a large portion of the population.

Nowadays, perfumery is an extremely competitive industry and, as such, a need for constant innovation and optimization of manufacturing processes emerges, without neglecting the increasing demands related to quality control. In this context, the present dissertation addressed pertinent aspects, not only regarding product development, but also quality control. Thus, the maceration of eight perfumes was monitored in order to evaluate the possibility of reducing the time associated with this process. The stability of the finished product over time was also studied, performing preliminary stability tests, accelerated tests and shelf-life tests.

Regarding the stability tests, the main aims were to estimate the shelf life of the perfumes under study, as well as to establish maximum acceptance limits of the product, concerning the physico-chemical parameters applied. In order to complement the quality control assurance of the finished product, the chemical changes that occur during perfume oxidation were studied, for which GC-MS spectra of oxidized and non-oxidized samples were analysed and compared. These analyses were revealing, allowing the identification of a common compound amongst oxidized fragrances, acetaldehyde diethyl acetal, as well as the loss of fundamental compounds to the fragrances under study.

Finally, the maceration studies performed proved to be promising, reaching the chemical equilibrium two weeks after perfume production and consequently, suggesting the possibility of reducing the maceration time of 5 out of the 8 perfumes under study in one week compared to the protocol currently implemented by Nortempresa.

**Keywords:** GC-MS, maceration, perfume, stability

# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Índice de figuras .....	x
Índice de tabelas.....	xii
Lista de abreviaturas .....	xiii
Capítulo 1- Introdução.....	15
Capítulo 2- Enquadramento teórico.....	17
2.1. O olfato.....	17
2.2. Introdução histórica.....	18
2.3. O perfume na atualidade .....	19
2.4. Composição dos perfumes .....	21
2.5. Estrutura base dos perfumes.....	22
2.6. Famílias olfativas.....	23
2.7. Classificação dos perfumes .....	25
2.8. A química das fragrâncias .....	26
2.9. Processo de produção.....	29
2.9.1. Maceração .....	30
2.10. Controlo de qualidade .....	32
2.10.1. Estabilidade .....	33
2.11. Métodos instrumentais para a análise de perfumes .....	38
2.11.1. Cromatografia Gasosa (GC).....	38
2.11.2. Espectrometria de Massa (MS).....	41
2.11.3. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) .....	43

<b>Capítulo 3 - Parte experimental</b> .....	45
3.1. Material .....	45
3.2. Instrumentação .....	45
3.3. Condições de análise e funcionamento do equipamento GC-MS .....	47
3.4. Técnicas analíticas aplicadas à análise de perfumes .....	49
3.4.1. Medição do pH .....	49
3.4.2. Medição da condutividade .....	50
3.4.3. Medição da densidade .....	51
3.4.4. Medição do teor alcoólico .....	52
3.4.5. Medição do índice de refração .....	52
3.4.6. Avaliação das características organoléticas.....	53
3.5. Seleção de amostras .....	53
3.6. Protocolo de avaliação de estabilidade.....	55
3.7. Protocolo de maceração .....	58
<b>Capítulo 4 – Resultados e discussão</b> .....	59
4.1. Estabilidade .....	59
4.1.1. Estabilidade preliminar .....	60
4.1.2. Estabilidade acelerada .....	62
4.1.3. Análises por GC-MS .....	67
4.2. Maceração .....	71
4.2.1. Amostras M1, M2, M3 e M4 .....	72
4.2.2. Amostras M5 e M6 .....	74
4.2.3. Amostras M7 e M8 .....	76
4.2.4. Aspectos globais da maceração .....	78
<b>Capítulo 5 – Considerações finais</b> .....	80
<b>Referências bibliográficas</b> .....	82

Anexo I: Representações gráficas dos resultados obtidos .....	87
---------------------------------------------------------------	----

# Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Organização do sistema olfativo <sup>3</sup> . .....	17
<b>Figura 2:</b> Exemplos de compostos patenteados pelas principais casas de perfume e respetivos aromas <sup>10-14</sup> . .....	20
<b>Figura 3:</b> Duração dos diferentes tipos de notas ao longo do tempo, de acordo com a sua volatilidade. ....	23
<b>Figura 4:</b> Classificação das fragrâncias consoante a sua percentagem de essência. ....	25
<b>Figura 5:</b> Exemplos de compostos utilizados em perfumaria e seu odor característico. ....	28
<b>Figura 6:</b> Estrutura do D-limoneno, L-limoneno e terpinoleno e respetivos aromas. ....	29
<b>Figura 7:</b> Síntese de Aurantiol (base de Schiff) a partir de Hidroxicitronelal e Antranilato de Metilo <sup>23</sup> . ...	31
<b>Figura 8:</b> Reação de formação de hemiacetal <sup>29</sup> . ....	31
<b>Figura 9:</b> Reação de transesterificação <sup>29</sup> . ....	32
<b>Figura 10:</b> Reações de acetilação <sup>29</sup> . ....	35
<b>Figura 11:</b> Reação de hidrólise ácida de um éster <sup>29</sup> . ....	35
<b>Figura 12:</b> Reação aldólica do fenilacetaldéido <sup>23</sup> . ....	36
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática que um cromatógrafo gasoso. ....	39
<b>Figura 14:</b> Representação do movimento das moléculas numa amostragem por headspace. ....	40
<b>Figura 15:</b> Representação esquemática de um espectrómetro de massa. ....	41
<b>Figura 16:</b> Representação esquemática que um analisador do tipo quadrupolo. ....	42
<b>Figura 17:</b> Representação esquemática que um detetor do tipo multiplicador de eletrões. ....	43
<b>Figura 18:</b> Equipamento utilizado nas análises de GC-MS. ....	47
<b>Figura 19:</b> Distribuição das amostras pelas diferentes condições de armazenamento. ....	56
<b>Figura 20:</b> Diagrama do procedimento de maceração adotado. ....	58
<b>Figura 21:</b> Alterações de cor na amostra E1 com indicação da avaliação correspondente, sendo que o primeiro frasco corresponde ao controlo. ....	64
<b>Figura 22:</b> Cromatogramas obtidos para a análise da amostra E7 nos estados oxidado e não oxidado (condições de análise indicadas na Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6). ....	68
<b>Figura 23:</b> Cromatogramas obtidos para a análise da amostra E8 nos estados oxidado e não oxidado (condições de análise indicadas na Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6). ....	69

<b>Figura 24:</b> Resultados obtidos para os parâmetros do pH, condutividade, densidade, índice de refração e teor alcoólico para as amostras M1, M2, M3 e M4 ao longo do ensaio de maceração.....	72
<b>Figura 25:</b> Resultados obtidos para os parâmetros do pH, condutividade, densidade, índice de refração e teor alcoólico para as amostras M5 e M6 ao longo do ensaio de maceração.....	75
<b>Figura 26:</b> Resultados obtidos para os parâmetros do pH, condutividade, densidade, índice de refração e teor alcoólico para as amostras M5 e M6 ao longo do ensaio de maceração.....	77
<b>Figura 27:</b> Representação gráfica dos valores de pH obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E1, E2 e E3).....	87
<b>Figura 28:</b> Representação gráfica dos valores de pH obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E4, E5 e E6).....	88
<b>Figura 29:</b> Representação gráfica dos valores de condutividade obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E1, E2 e E3). ....	89
<b>Figura 30:</b> Representação gráfica dos valores de condutividade obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E4, E5 e E6). ....	90
<b>Figura 31:</b> Representação gráfica dos valores de densidade obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E1, E2 e E3). ....	91
<b>Figura 32:</b> Representação gráfica dos valores de densidade obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E4, E5 e E6). ....	92
<b>Figura 33:</b> Representação gráfica dos valores de pH, condutividade e densidade obtidos nos testes de estabilidade à radiação UV.....	93

# Índice de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Classificação de terpenóides consoante o número de unidades de isopreno (adaptado de <sup>31</sup> ).	27
<b>Tabela 2:</b> Características dos materiais de vidro utilizados.	45
<b>Tabela 3:</b> Características dos equipamentos utilizados.	46
<b>Tabela 4:</b> Condições de análise do headspace.	48
<b>Tabela 5:</b> Condições de análise do GC.	48
<b>Tabela 6:</b> Condições de análise do MS.	48
<b>Tabela 7:</b> Amostras utilizadas nos estudos de estabilidade e respetivos perfis olfativos.	54
<b>Tabela 8:</b> Amostras utilizadas nos estudos de maceração e respetivos perfis olfativos.	54
<b>Tabela 9:</b> Intervalos de valores obtidos para pH, condutividade e densidade, e variações máximas para cada parâmetro nos ensaios de estabilidade preliminar.	60
<b>Tabela 10:</b> Avaliação das características organoléticas das amostras ao longo dos três e seis ciclos de análise.	61
<b>Tabela 11:</b> Intervalos de valores obtidos para pH, condutividade e densidade, e variações máximas para cada parâmetro nos ensaios de estabilidade acelerada.	62
<b>Tabela 12:</b> Avaliação das características organoléticas das amostras ao longo do período de estabilidade acelerada.	63
<b>Tabela 13:</b> Intervalo da variação de pH, condutividade e densidade observados entre os pontos de LA e de MA, em relação ao odor.	65
<b>Tabela 14:</b> Intervalos de valores obtidos para pH, condutividade e densidade, e variações máximas para cada parâmetro nos ensaios de exposição à radiação solar para a amostra E6.	66

## Lista de abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	Butil-hidroxitolueno
CE	Eletroforese capilar (Ing. <i>capillary electrophoresis</i> )
EdC	<i>Eau de Cologne</i>
EdP	<i>Eau de Parfum</i>
EdT	<i>Eau de Toilette</i>
EI	Impacto Eletrônico (Ing. <i>electron ionization</i> )
FID	Detetor de ionização de chama (Ing. <i>flame ionization detector</i> )
GC	Cromatografia gasosa (Ing. <i>gas chromatography</i> )
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massa (Ing. <i>gas chromatography /mass spectrometry</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (Ing. <i>high performance liquid chromatography</i> )
IFRA	Ing. <i>International Fragrance Association</i>
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
LA	Ligeiramente alterado
LC	Cromatografia líquida (Ing. <i>liquid chromatography</i> )
MA	Muito alterado
MS	Espectrometria de massa (Ing. <i>mass spectrometry</i> )
NA	Não alterado
NIST	Ing. <i>National Institute of Standards and Technology</i>
PG	Propileno glicol
RIFM	Ing. <i>Research Institute for Fragrance Materials</i>
SFC	Cromatografia de fluido supercrítico (Ing. <i>supercritical fluid chromatography</i> )
SNC	Sistema nervoso central

t0	Tempo inicial
UV	Ultravioleta

# Capítulo 1- Introdução

A perfumaria é uma área com milhares de anos de história e que ainda se mantém relevante nos dias que correm. Esta indústria é de extrema competitividade, havendo a constante necessidade de inovação e aperfeiçoamento dos métodos de produção. Atualmente há uma busca por novos processos de fabrico, que permitam a redução dos custos associados, mantendo a qualidade do produto final.

A maceração é um passo fundamental na produção de perfumes, no entanto traduz-se em custos elevados para o produtor, uma vez que o produto se encontra indisponível para venda por um período alargado de tempo. A redução deste tempo é o objetivo de todas as casas de perfume, porém é necessário garantir a total maceração do perfume antes de se proceder ao seu engarrafamento e comercialização.

Para que um produto seja comercializado e tenha sucesso no mercado é imperativo que seja submetido a um controlo de qualidade apertado. Para tal, aquando do processo de desenvolvimento do produto, os perfumes são submetidos a testes de estabilidade que permitem prever o seu comportamento quando sujeito às condições de transporte e armazenamento. Os testes de estabilidade preliminares permitem ainda estimar o prazo de validade do produto em questão.

A Nortempresa, sendo a única empresa especializada na produção de perfumes a nível nacional, pretende manter a sua competitividade no mercado internacional. Para tal é fundamental a constante otimização dos seus produtos e processos de fabrico, de modo a garantir não só a satisfação do cliente, mas também a qualidade do produto e redução dos custos de fabrico.

Um dos objetivos desta dissertação foi estudar a maceração dos produtos de forma a otimizar este processo. Pretendeu-se também aperfeiçoar protocolos de estabilidade dos perfumes produzidos pela Nortempresa, assim como estudar os fenómenos associados à oxidação dos mesmos. Sentiu-se ainda a necessidade de averiguar quais os parâmetros físico-químicos que fornecem mais informação acerca dos estudos de maceração e estabilidade, de modo a possibilitar futuras avaliações mais rápidas e direcionadas.

Assim, diversos perfumes foram submetidos a diferentes períodos de maceração como objetivo de tentar identificar o ponto a partir do qual o perfume se encontra totalmente macerado. As fragrâncias foram

ainda submetidas a diversos ensaios de estabilidade, de modo a verificar se estas mantêm as suas propriedades quando sujeitas a fatores de instabilidade, permitindo desta forma a estimação do prazo de validade. O seguimento destes processos foi efetuado através de análises físico-químicas (pH, condutividade, índice de refração, densidade e teor alcoólico) e organoléticas. O estudo de oxidação dos perfumes foi realizado através de análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

A presente dissertação é composta por 5 capítulos fundamentais.

No primeiro capítulo é apresentado um breve enquadramento da dissertação, assim como os principais objetivos e sua a estrutura.

O segundo, consiste num levantamento teórico dos conceitos relevantes ao tema em estudo. Neste capítulo é feita uma contextualização da área da perfumaria e são introduzidos os conceitos de maceração e estabilidade. São ainda abordadas as técnicas analíticas utilizadas nos ensaios realizados, apresentando os fundamentos teóricos das técnicas de espectrometria de massa (MS) e cromatografia gasosa (GC).

A parte experimental, onde são referidos os materiais e metodologias adotados, encontra-se descrita no terceiro capítulo.

No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos para os diferentes estudos realizados.

Por fim, o quinto capítulo apresenta as considerações finais de todo o trabalho desenvolvido, assim como orientações para possíveis futuros estudos.

## Capítulo 2- Enquadramento teórico

### 2.1. O olfato

Ao longo da evolução biológica, o sistema olfativo tem desempenhado um papel fulcral na modulação do comportamento animal e, por conseguinte, na sua sobrevivência. Uma vasta gama de comportamentos em diferentes animais baseia-se em pistas olfativas, desde o acasalamento à defesa territorial<sup>1</sup>. O ser humano inicia o desenvolvimento deste sentido no terceiro trimestre de gestação e põe-no em uso logo à nascença, identificando o mamilo da mãe pelo odor do leite materno<sup>2</sup>. Apesar de significativamente menos desenvolvido que o de outros animais, o sistema olfativo humano permite distinguir entre cerca de 10 000 odores. Cerca de 3% do genoma humano, que corresponde a 1 000 genes, é responsável pela codificação de um número equivalente de recetores olfativos, localizados no epitélio olfativo, na parte superior da cavidade nasal<sup>3</sup>. A organização do sistema olfativo encontra-se representada na Figura 1.

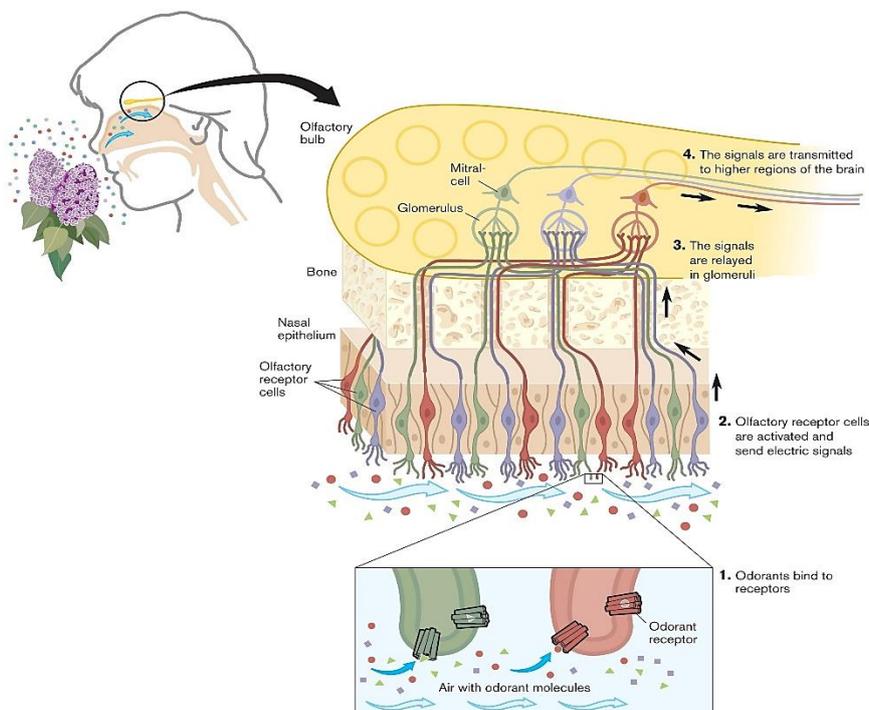


Figura 1: Organização do sistema olfativo<sup>3</sup>.

Os recetores olfativos têm afinidade para uma variedade de odores, assim como cada odor é capaz de se ligar a diferentes recetores<sup>4</sup>. No entanto, para que os odores sejam reconhecidos, é imperativo que estes sejam voláteis e lipofílicos. Assim, grupos funcionais, estrutura e massa molecular são fatores de elevada importância na percepção e discriminação de cheiros<sup>5</sup>. A resposta que vai ser desencadeada a um determinado odor será também dependente da sua concentração e intensidade.

O epitélio olfativo é revestido por uma mucosa, a mucosa olfativa, que envolve inúmeras terminações nervosas do nervo olfativo. As substâncias voláteis e lipossolúveis são dissolvidas na mucosa, atingindo as dendrites das células nervosas olfativas, onde se encontram os recetores<sup>6</sup>. Estes neurónios vão gerar impulsos nervosos que serão conduzidos até ao bulbo olfativo e posteriormente até ao sistema nervoso central (SNC), dividindo-se a informação entre o hipocampo e o sistema límbico. O facto de o sistema olfativo se encontrar intimamente ligado ao sistema límbico explica a capacidade que os odores têm de influenciar subconscientemente o nosso comportamento e estado de espírito<sup>7</sup>.

## 2.2. Introdução histórica

A primeira referência ao uso de fragrâncias remonta às antigas civilizações egípcias, por volta de 2 400 AC<sup>7</sup>. O seu modo de utilização passava pela queima de certas madeiras, resinas, ervas e frutos, que lançavam aromas agradáveis para o ambiente envolvente. Este ato era praticado durante rituais de homenagem aos Deuses, para que estes atendessem às suas preces, revelando uma íntima relação entre a perfumaria e a religião<sup>8</sup>. As nuvens de fumo resultantes destes rituais deram origem ao nome que atualmente se emprega, perfume, do latim *per fumum*.

Como resultado da evolução do conhecimento do Homem, evoluíram também as aplicações que este deu às fragrâncias. A partir do século XVI AC, para além do uso sob a forma de incenso, o perfume passou a ser um passo importante no processo de mumificação e começaram a surgir bálsamos e óleos perfumados para aplicações médicas. A preparação dos bálsamos consistia na infusão de óleos animais ou vegetais com flores e resinas para que “absorvessem” os seus aromas. A utilização desses óleos pelo

seu aroma, e como meio de compensar a falta de higiene sentida na época, só se deu com a chegada desta cultura às civilizações grega e romana.

O perfume como atualmente o conhecemos surgiu da cultura árabe, que para além de aperfeiçoar os métodos de extração de óleos essenciais, foi responsável pela introdução do álcool como base dos perfumes<sup>9</sup>. Este crescimento científico levou ao surgimento de inúmeras novas matérias-primas, sendo extraídos os óleos essenciais de todo o tipo de flores, frutos, resinas, madeiras, entre outros. Assim, as combinações possíveis para a formulação de um perfume cresceram exponencialmente.

O surgimento de matérias-primas de origem animal trouxe uma maior complexidade aos perfumes, sendo estes aromas ainda utilizados nos dias de hoje. Os compostos de origem animal mais utilizados são o almíscar (cervo-almíscarado), *ambergris* (cachalote), *civet* (civeta) e *castoreum* (castor). Estas matérias-primas são extraídas de glândulas secretoras de animais, à exceção do *ambergris*, que é obtido de uma massa, de origem incerta, produzida no trato digestivo do cachalote, e posteriormente expelida. Estas notas animais, para além dos seus aromas únicos, trazem a vantagem de serem pouco voláteis, atuando como fixadores naturais.

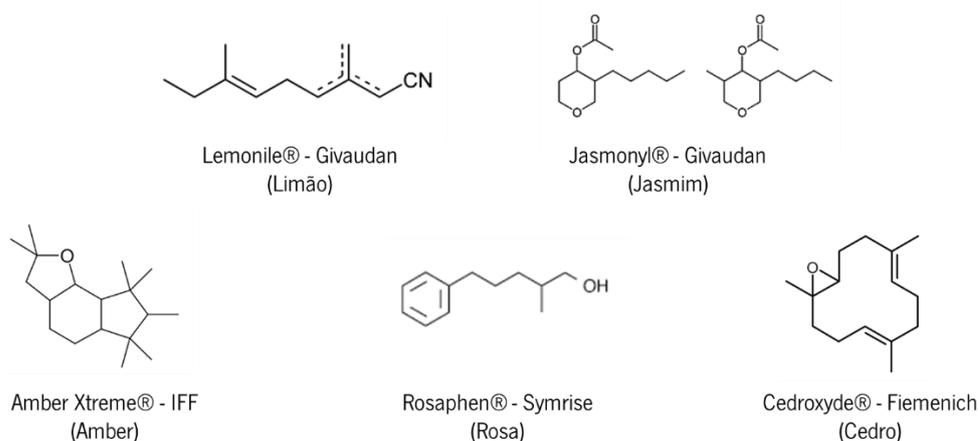
A cultura perfumista viajou pelos continentes, contudo o seu uso restringia-se a elementos da alta sociedade, devido aos elevados custos de extração e obtenção das matérias-primas. A revolução industrial e o progresso que se fez sentir na área da química orgânica levou ao desenvolvimento de métodos para obtenção de essências sintetizadas em laboratório. Este passo permitiu uma diminuição do preço final dos perfumes, tornando o que outrora era considerado um luxo, num produto acessível a qualquer membro da sociedade<sup>7</sup>.

### 2.3. O perfume na atualidade

O imenso crescimento que se deu na área da perfumaria levou a uma sobreexploração das matérias-primas e pôs em causa a continuidade de algumas espécies, tanto vegetais como animais. A preocupação com a preservação das espécies aliou-se à busca de produtos a custo mais reduzido e incitou o desenvolvimento de novas essências artificiais. Este desenvolvimento trouxe uma nova

componente de concorrência entre as casas de perfumes. Nos dias que correm, a perfumaria é uma indústria multimilionária e extremamente competitiva.

Os óleos essenciais naturais são misturas extremamente complexas, podendo conter centenas de compostos. A composição de uma essência natural está intimamente relacionada com as condições em que as plantas se desenvolvem, dependendo assim do tipo de solo onde crescem, condições climáticas, pressão atmosférica, entre outros, fatores que dificultam a replicação e controlo de uma fragrância. Atualmente as casas de perfumes investem intensivamente na inovação e desenvolvimento de novos aromas sintéticos, que permitem a obtenção das fragrâncias pretendidas sem a exploração dos recursos naturais e uma fração do custo. A competitividade que se observa nesta indústria é justificada pelo registo de patentes destes novos aromas. A Figura 2 mostra alguns exemplos de compostos patenteados pelas principais casas de perfumes. As empresas responsáveis pelo desenvolvimento ficam, desta forma, com uso exclusivo dos compostos por eles patenteados. Grande parte dos perfumes no mercado atual contém tanto essências sintéticas como de origem natural<sup>5</sup>.



**Figura 2:** Exemplos de compostos patenteados pelas principais casas de perfume e respetivos aromas<sup>10-14</sup>.

Uma vez que um perfume é geralmente aplicado sobre a pele e muitas vezes inalado aquando da sua aplicação, a segurança dos componentes de um perfume é de extrema importância. Independentemente da sua origem e da sua formulação, um perfume normalmente contém compostos passíveis de induzir reações alérgicas. O uso destes alérgenos é, em 90% do mercado global, regulamentado pela *International Fragrance Association (IFRA)*, em parceria com o *Research Institute for Fragrance Materials*

(RIFM). Estas entidades limitam a concentração a que cada alérgeno pode ser utilizado, consoante a sua aplicação, havendo ainda compostos cuja utilização é expressamente proibida<sup>15</sup>.

## 2.4. Composição dos perfumes

O componente fundamental de um perfume é a essência, que lhe confere a sua fragrância e personalidade. De um modo geral a formulação de um perfume contém ainda álcool etílico, água desionizada, podendo ainda ser adicionados compostos minoritários. O etanol é utilizado pela sua elevada volatilidade, que permite uma evaporação rápida aquando do contacto com a pele. A sua natureza tanto hidrofílica (grupo hidroxilo) como hidrofóbica (cadeia alquílica) permite a dissolução dos óleos essenciais em solução aquosa<sup>16</sup>.

O uso da água permite a redução do odor do álcool e, acima de tudo, do preço final do produto<sup>17,18</sup>. Uma vez que a essência é constituída por óleos, a presença de água na fórmula, mesmo em quantidades reduzidas, pode gerar turbidez no produto final. Dado que a imagem é um fator de elevada relevância na comercialização de um perfume, pode ser adicionado um agente solubilizante, como o óleo de ricínio, para combater essa turbidez indesejada.

A qualidade de um perfume para o consumidor baseia-se na sua perceção da fragrância e na duração da mesma na pele ao longo do tempo. De forma a prolongar a fixação do perfume na pele, são muitas vezes empregues agentes fixadores, que permite retardar a volatilização dos compostos, ocorrendo assim uma dissipação mais lenta da fragrância<sup>19</sup>.

Para o fabricante e agentes reguladores, o termo qualidade possui uma outra conotação, sendo necessário garantir que o produto final mantém as suas características ao longo do prazo de validade. A estabilidade de um perfume pode ser posta em causa quando este sofre exposição prolongada a fatores como a luz, temperatura e ar, podendo provocar a sua degradação e originar odores desagradáveis e alterações a nível da cor. Para tentar combater os efeitos destes fatores podem ser adicionados agentes antioxidantes e filtros ultravioleta. Os agentes antioxidantes, como o butil-hidroxitolueno (BHT), atuam inativando radicais livres, evitando desta forma a ocorrência de oxidações e a consequente degradação do perfume<sup>20</sup>. A radiação ultravioleta (UV) é responsável por reações catalíticas e de oxidação, sendo que

estas podem ser evitadas com a utilização de filtros capazes de absorver este tipo de radiação. Um dos filtros UV mais utilizados em perfumaria é a benzofenona, que tem a capacidade de absorver a radiação UVA e UVB<sup>21</sup>.

Por vezes, de modo a tornar o produto mais apelativo, é de interesse a obtenção de perfumes coloridos. Esta coloração pode ser conseguida utilizando óleos essenciais com pigmentação natural intensa, ou adicionando corantes artificiais à formulação da essência. O uso de corantes sintéticos pode, no entanto, comprometer a estabilidade do produto, sendo imperativo o estudo prévio do seu comportamento e estabilidade<sup>22</sup>.

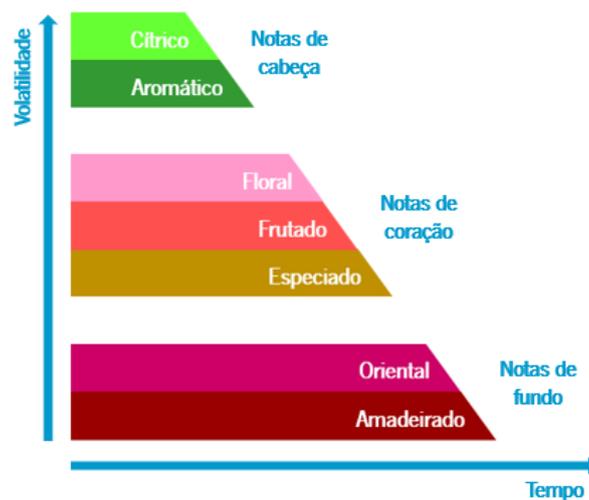
## 2.5. Estrutura base dos perfumes

A terminologia musical é comumente utilizada em perfumaria, expressando a forma como uma fragrância é construída. As notas correspondem aos elementos base de uma fragrância que, tal como na música, quando em combinação, compõem um acorde. As notas olfativas são divididas em três categorias distintas, consoante a sua volatilidade: notas de cabeça, notas de coração e notas de fundo, representadas na Figura 3.

**Notas de cabeça:** estas notas são responsáveis pela primeira impressão que se tem de uma fragrância, sendo por isso essenciais no momento de escolha de um perfume. Esta categoria engloba os compostos mais voláteis, cuja evaporação se inicia assim que o perfume entra em contacto com a pele ou até como o ar. Notas de cabeça são pouco duradouras, tendo um tempo de vida na pele de cerca de 15 minutos. Fazem parte deste conjunto de notas odores tipicamente frescos fazem parte, como compostos cítricos (limão, bergamota, etc.) e ervas (eucalipto, menta, etc.)<sup>23</sup>.

**Notas de coração:** notas que emergem quando as notas de cabeça se dissipam, expressando o carácter do perfume. Estas notas dão a identidade à fragrância e compreendem compostos com volatilidade intermédia, podendo persistir na pele até 4 horas. Em perfumes femininos estas notas são tipicamente florais (*rosa, ylang ylang*, etc.) e frutados (maçã, pêra, etc.), enquanto que em perfumes masculinos são geralmente utilizadas notas aromáticas (gengibre, canela, etc.) e verdes (pinho, feto, etc.)<sup>23</sup>.

**Notas de fundo:** notas consideradas fixadoras, sendo estas as últimas a evaporar, fornecendo persistência à fragrância. Este conjunto de notas compreende compostos pouco voláteis, de elevada massa molecular, que podem persistir na pele cerca de 8 ou mais horas. Fazem parte desta categoria notas amadeiradas (patchouli, vetiver, etc.), orientais (baunilha, fava tonka, etc.) e ainda notas animais (ambergris, civet, etc.)<sup>23</sup>.



**Figura 3:** Duração dos diferentes tipos de notas ao longo do tempo, de acordo com a sua volatilidade.

Um perfume bem estruturado será uma mistura de notas de cabeça, de coração e de fundo. Um perfumista irá contruir o seu perfume tendo por base um modelo de pirâmide, sendo que as notas de fundo normalmente surgem em maior proporção, de 45 % a 65 %, as de coração, entre 30 % e 40 %, e as de cabeça até 25 %<sup>5,24</sup>.

## 2.6. Famílias olfativas

A percepção que se tem de uma fragrância é algo muito pessoal, visto que um simples odor pode despoletar sensações agradáveis num indivíduo e menos agradáveis noutro. Apesar da descrição de uma fragrância ser difícil de padronizar, foram criadas famílias olfativas que agrupam notas com odores

semelhantes. Cada família olfativa tem características comuns, podendo estas ser ainda divididas em subfamílias. Este modo de classificação permite uma descrição relativamente coerente das fragrâncias entre casas de perfumes e auxilia o consumidor numa escolha mais acertada, tendo em conta o seu gosto pessoal. As famílias olfativas são as seguintes<sup>5,25</sup> :

**Floral**<sup>23</sup>: a família olfativa mais tradicional, sendo as suas notas geralmente muito evidentes e fáceis de identificar num perfume. Confere um toque romântico e delicado a uma fragrância, sendo por isso preferencialmente empregue em perfumes femininos. Exemplos de notas florais são a rosa, o jasmim, orquídea, lírio, entre outras.

**Frutado**<sup>23</sup>: família que se tornou muito popular nos últimos anos, proporcionando uma sensação refrescante, e jovial. Concedem um toque fresco, exótico e, ao mesmo tempo, adocicado a uma fragrância. Esta família engloba todos os frutos à exceção dos citrinos, que pela sua individualidade são englobados numa família própria. Maçã, maracujá, pêssigo e frutos vermelhos são algumas das notas que se pode encontrar nesta família.

**Cítrico**<sup>23</sup>: historicamente das primeiras notas a ser aplicadas a perfumaria. Notas frescas e leves, que tipicamente correspondem a notas de saída (de cabeça) de um perfume. Compreende todas as frutas cítricas, como o limão e a bergamota, ou matérias-primas com aroma cítrico, como o néroli e lúcia-lima.

**Chypre**<sup>23</sup>: esta é uma das famílias mais antigas, que nasceu do prestígio ganho por um perfume de 1917 com o mesmo nome. A base dos perfumes desta família consiste em notas de bergamota, musgo de carvalho, patchouli e ládano. Esta família de fragrâncias é característica de perfumes femininos.

**Oriental**<sup>23</sup>: família caracterizada pelos seus aromas especiados, ricos e quentes. Engloba notas fortes, geralmente as mais marcantes num perfume. Esta família olfativa inclui ingredientes provenientes do médio oriente, tais como a canela, baunilha, pimentas e noz moscada.

**Aromático**<sup>23</sup>: tal como o próprio nome indica, esta família engloba ervas aromáticas, como tomilho, rosmaninho, sálvia e açafrão, gerando fragrâncias que tanto podem ter nuances frescas e suaves como picantes e intensas. Fragrâncias aromáticas são geralmente reservadas ao público masculino.

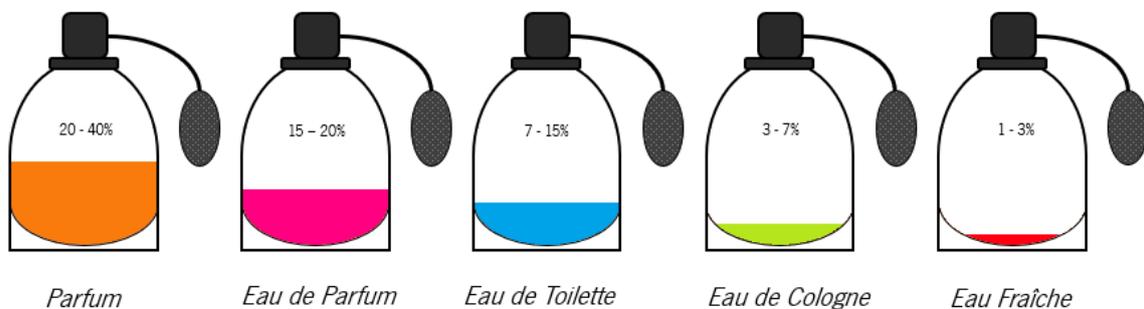
**Fougère**<sup>23</sup>: tal como chypre, esta família é baseada num perfume que revolucionou a indústria perfumista. O conceito dos perfumes da família fougère é replicar a essência de uma floresta verde e húmida, resultando em aromas terrosos e herbáceos. São tipicamente utilizadas notas amadeiradas e cítricas, assim como lavanda, musgo de carvalho e cumarina. Estas são fragrâncias masculinas por excelência.

**Amadeirado**<sup>23</sup>: família de fragrâncias opulentas, quentes e exóticas. Esta família gera predominantemente perfumes masculinos. São tipicamente utilizadas notas de sândalo, patchouli, cedro e vetiver.

Um perfume é, por norma, uma combinação de mais do que uma família olfativa, no entanto é comum que uma seja mais predominante na fragrância do que as outras.

## 2.7. Classificação dos perfumes

Como descrito anteriormente, um perfume pode ser classificado quanto às suas famílias olfativas. Outra classificação pode ainda ser feita, tendo em conta a percentagem de essência utilizada no seu fabrico, sendo que a proporção de essência de um perfume vai influenciar a sua intensidade e persistência na pele. A Figura 4 demonstra as diferentes classes de perfumes, consoante a sua percentagem de essência.



**Figura 4:** Classificação das fragrâncias consoante a sua percentagem de essência.

O *Parfum* é a forma mais prestigiosa de uma fragrância, contendo uma concentração de essência entre 20 e 40 %. Esta gama de concentrações permite uma maior persistência da fragrância na pele, podendo durar até 10 horas, com uma menor quantidade de perfume aplicada. Uma vez que o elemento mais dispendioso num perfume é a essência, esta alternativa é significativamente mais dispendiosa comparativamente com fragrâncias mais diluídas.

A classe dos *Eau de Parfum* (EdP) é a variante de perfumes mais eficiente para o seu preço. Contendo entre 15 e 20 % de essência, esta classe de fragrâncias consegue conjugar uma persistência de cerca de 8 horas com um preço significativamente mais acessível do que um *Parfum*.

A *Eau de Toilette* (EdT) é atualmente a classe de perfumes mais comercializada, sendo uma das opções mais acessíveis. Geralmente as grandes marcas oferecem para as suas fragrâncias, tanto a opção de EdP como a de EdT, sendo a última uma versão mais diluída, com apenas 7 a 15 % de essência na sua formulação. Esta opção tem geralmente uma curta duração na pele, não ultrapassando as 4 horas.

A classe das *Eau de Cologne* (EdC) é das opções mais diluídas de perfume, contendo somente entre 3 e 7 % de essência. Este tipo de fragrância é relativamente económica, no entanto não permanece mais de 2 horas na pele, sendo usado tipicamente para refrescar ao longo do dia.

O produto mais diluído em perfumaria é a *Eau Fraîche*, que contém na sua formulação menos de 3 % de essência. Embora com diferentes aplicações, em termos de percentagem de essência, a *Eau Fraîche* assemelha-se a um *aftershave*. Estes produtos não são utilizados como fragrâncias diárias, sendo que o seu aroma dissipa em menos de 1 hora<sup>7,10</sup>

## 2.8. A química das fragrâncias

Os compostos presentes numa fragrância podem ser divididos em alifáticos, benzenóides e terpenóides<sup>28</sup>. Os compostos alifáticos caracterizam-se pela sua cadeia aberta, englobando ainda compostos cíclicos que se assemelham a compostos de cadeia aberta. Os benzenóides, como o próprio nome indica, abrangem todos os compostos que contêm pelo menos um benzeno<sup>29</sup>. Os terpenóides constituem o maior grupo de odorantes naturais e, como tal, a grande maioria dos ingredientes utilizados em fragrâncias fazem parte desta família<sup>7</sup>. Estes compostos são constituídos por unidades-base pentacarbonadas, os isoprenos. Assim, consoante o número de unidades de isoprenos, os terpenóides podem ser classificados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, etc (Tabela 1)<sup>30</sup>.

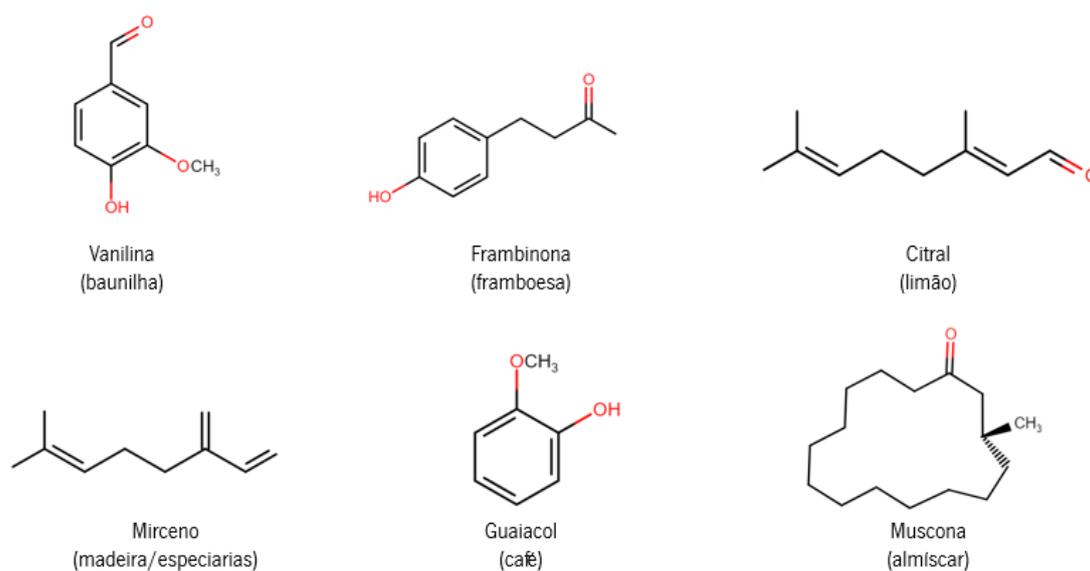
**Tabela 1:** Classificação de terpenóides consoante o número de unidades de isopreno (adaptado de <sup>31</sup>).

Nº de unidades	Nº de Carbonos	Classe	Estrutura
1	5	Isopreno	
2	10	Monoterpenóide	
3	15	Sesquiterpenóide	
4	20	Diterpenóide	
5	25	Sesterterpenóides	
6	30	Triterpenóides	
8	40	Tetraterpenóides	
n	5n	Politerpenóide	

Para que um composto de uma fragrância seja perceptível ao nariz humano, este deverá ter uma reduzida massa molar, idealmente inferior a 300 g/mol, característica que permite que se mantenham parcialmente voláteis à temperatura ambiente. Pela sua massa molar, as classes de terpenóides mais aplicadas em perfumaria são então os monoterpénóides e sesquiterpenóides, sendo que os primeiros constituem cerca de 90% dos terpenóides utilizados<sup>5,31</sup>.

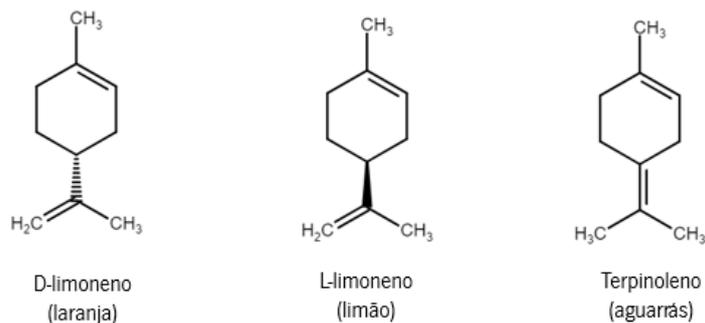
Todas as classes de compostos presentes numa fragrância podem possuir grupos funcionais na sua estrutura, como álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas, entre outros. Os ésteres são amplamente utilizados nesta indústria pelas suas notas doces, conferindo características florais e frutadas às fragrâncias. Alguns exemplos de ésteres tipicamente usados são o acetato de geranilo, que concede aroma a rosas, e o acetato de benzilo, que transmite notas de jasmim ou maçã à fragrância. Os aldeídos, por sua vez, conferem notas tipicamente cítricas e frescas, como é o caso do citral, com odor a limão, e o hexanal, cujo aroma remete ao cheiro a relva acabada de cortar. Para além das notas frescas, existem aldeídos capazes de proporcionar notas mais características, como é o caso do cinamaldeído, composto que confere o aroma típico da canela<sup>30</sup>.

As cetonas são utilizadas em menor escala, no entanto estas podem proporcionar aromas relevantes num perfume, como é o caso da ciclopentadecanona, que confere um odor tipicamente almíscarado. Em perfumaria os álcoois são compostos de extrema importância, que transmitem notas características tipicamente aplicadas a fragrâncias. Alguns exemplos destes são o linalool, que confere um aroma floral, o nerol, com fragrância a flor de laranjeira, e o geraniol, com cheiro a rosa <sup>30</sup>. A Figura 5 apresenta alguns compostos utilizados em perfumaria e o seu odor característico.



**Figura 5:** Exemplos de compostos utilizados em perfumaria e seu odor característico.

A percepção que se tem de um composto vai depender da sua estrutura, sendo que uma pequena alteração de configuração vai originar uma variação drástica no odor sentido, sendo o limoneno um excelente exemplo deste fenómeno<sup>32,33</sup>. O enantiómero R do limoneno, tipicamente denominado de D-limoneno, possui um aroma a laranja, enquanto que o L-limoneno, enantiómero S, tem um cheiro a limão. Já o seu isómero, terpinoleno, possui um odor a aguarrás. As estruturas destes compostos encontram-se representadas na Figura 6.



**Figura 6:** Estrutura do D-limoneno, L-limoneno e terpinoleno e respectivos aromas.

Outro fator igualmente relevante é a concentração do composto em uso, que poderá alterar totalmente a forma como este será sentido. Um caso que explica perfeitamente este fenômeno é o do indol, uma amina que possui um odor pútrido quando em elevadas concentrações, mas que quando diluído detém um aroma floral <sup>34</sup>.

## 2.9. Processo de produção

O primeiro passo no processo de criação de um novo perfume consiste na escolha da fragrância e tipo de produto (EdP, EdT, EdC, etc.) pretendidos. Posto isto recorre-se a ensaios que visam aprimorar a formulação do produto, avaliando a estabilidade do mesmo. Este passo é essencial ao processo de desenvolvimento uma vez que permite avaliar a eficácia dos agentes antioxidantes e filtros UV, quando aplicados, e ainda estimar o prazo de validade do produto.

Após a otimização da formulação, procede-se à produção do perfume em grande escala, fazendo-se a mistura dos vários componentes em cubas de aço inoxidável, onde este permanecerá durante todo o período de maceração.

## 2.9.1. Maceração

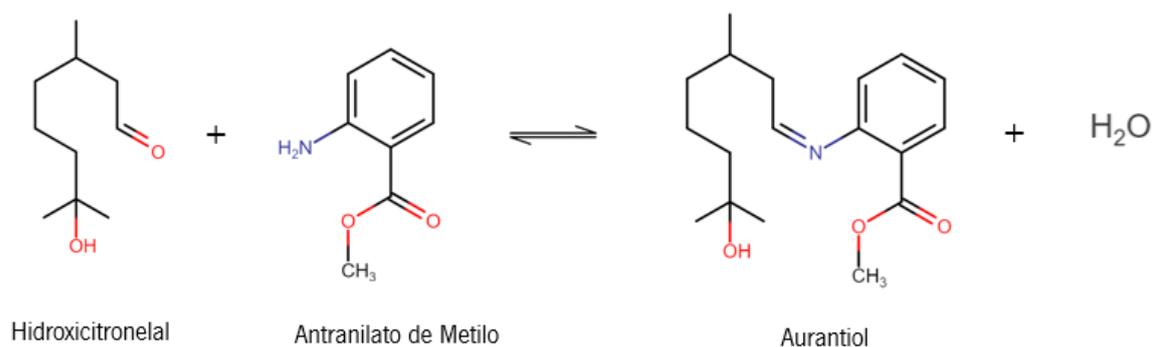
Em química o termo maceração é aplicado à obtenção de um extrato por meio de uma extração por solvente (óleo quente). Na indústria da perfumaria este termo tem outra conotação, sendo a maceração o procedimento adotado com o objetivo de estabilizar um perfume antes da sua comercialização. Este processo é um dos passos fundamentais na produção de um perfume, e poucas casas de perfumes revelam o seu protocolo de maceração, sendo este um dos segredos mais bem guardados da indústria<sup>35</sup>.

A maceração de um perfume começa quando se faz a mistura entre os óleos essenciais e o álcool. Para assegurar que se obtém uma mistura homogênea recorre-se a agitação mecânica, no entanto esta ação não é suficiente para garantir a total homogeneidade da solução. A dispersão das moléculas da essência na solução hidroalcoólica vai promover uma série de reações químicas entre estas duas fases. O objetivo da maceração é atingir um equilíbrio químico, garantindo desta forma a uniformidade do produto<sup>36</sup>.

O processo de maceração, na maior parte dos casos, consiste em manter o perfume em grandes cubas de aço inoxidável por um período de semanas ou mesmo meses. Para além de permitir que as características olfativas da essência sejam transferidas para o solvente, durante este período o odor do etanol torna-se menos intenso. Desta forma é possível intensificar a percepção das notas olfativas do perfume, tornando-o significativamente mais coeso e harmonioso<sup>36</sup>.

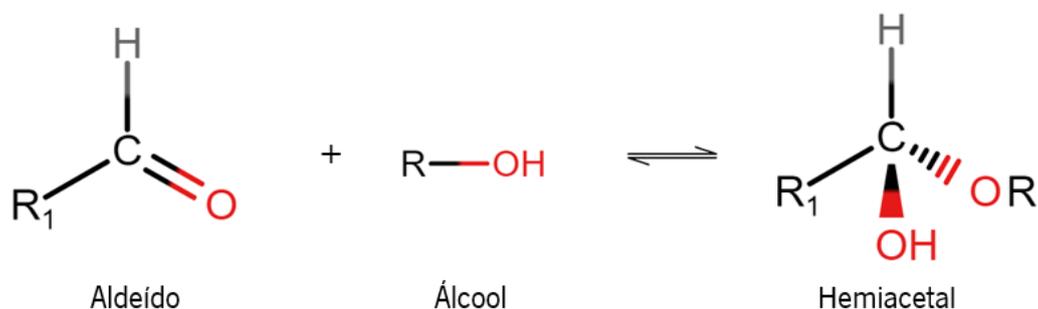
Como supramencionado, a essência de um perfume pode conter centenas de compostos, como álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, entre outros, podendo dar origem a diversas reações químicas. Estas reações dão-se assim que é iniciado o processo de maceração, gerando um “efeito de cascata”, ocorrendo reação atrás de reação<sup>37</sup>.

Uma das possíveis reações passíveis de ocorrer em perfumes é a formação de bases de Schiff, representada na Figura 7. A conjugação de uma amina primária com um aldeído ou uma cetona leva à geração de uma imina (base de Schiff), com libertação de água<sup>23</sup>. Poucas aminas têm odor agradável, e como tal são raras as aplicações em fragrâncias, no entanto, a formação de aurantiol é o principal exemplo em perfumaria<sup>38</sup>. O antranilato de metilo possui um aroma frutado, sendo um dos compostos presentes em certas uvas, já a sua base de Schiff, o aurantiol, concede um odor floral às fragrâncias.



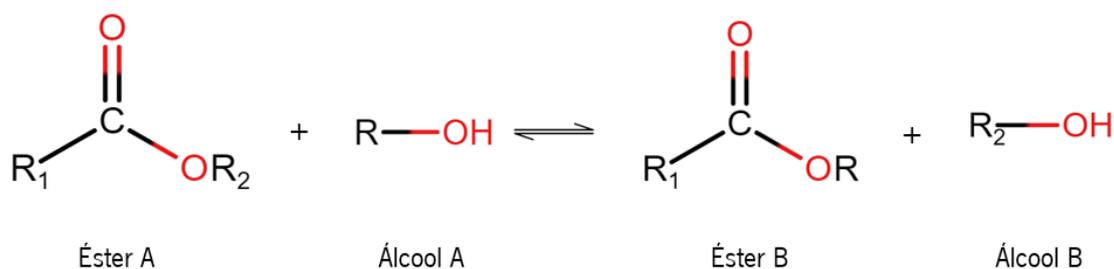
**Figura 7:** Síntese de Aurantiol (base de Schiff) a partir de Hidroxicitronelal e Antranilato de Metilo<sup>23</sup>.

Consoante a formulação da essência é possível a ocorrência de diferentes reações, tais como acetilações e transesterificações<sup>23</sup>. As acetilações, apresentadas na Figura 8, ocorrem da reação de um aldeído com um álcool, gerando um hemiacetal, composto que é simultaneamente um álcool e um éster<sup>29</sup>.



**Figura 8:** Reação de formação de hemiacetal<sup>29</sup>.

Os ésteres estão presentes na grande maioria das fragrâncias e, como tal, a ocorrência de transesterificações e hidrólise dos mesmos é extremamente comum. No processo de transesterificação, um éster reage com um álcool, dando origem a um novo éster e um novo álcool<sup>29</sup>. Esta reação encontra-se representada, de um modo geral, na Figura 9.



**Figura 9:** Reação de transesterificação<sup>39</sup>.

Todas estas reações dão-se sucessivamente até que a solução atinja o equilíbrio. Assim que é atingido o equilíbrio considera-se que o produto se encontra completamente macerado.

Durante o período de maceração ocorre por vezes a precipitação dos compostos ceratos intrínsecos à essência utilizada, e cuja presença no produto final pode comprometer a sua estabilidade ao longo do tempo. Após a maceração, o produto é submetido a um período a baixas temperaturas, que permite a precipitação destas ceras, removidas posteriormente por filtração, juntamente com outras partículas em suspensão. Depois de todos estes processos, são obtidas as características organoléticas desejadas para o perfume e este fica pronto a ser comercializado.

## 2.10. Controlo de qualidade

Em qualquer indústria é essencial manter um sistema de qualidade de modo a garantir a conformidade, qualidade e segurança dos produtos fabricados. Para tal são criados documentos normativos que visam padronizar procedimentos, especificações e recomendações técnicas de modo a assegurar o cumprimento dos requisitos de qualidade para a área em questão. A norma ISO 22716 fornece orientações sobre boas práticas de fabrico na área da cosmética, onde se insere a indústria da perfumaria. Esta norma incide nos tópicos de produção, controlo, armazenamento e distribuição de produtos cosméticos<sup>39</sup>.

## 2.10.1. Estabilidade

A garantia da qualidade e segurança de um perfume é posta à prova recorrendo a testes de estabilidade, que visam acelerar as reações químicas passíveis de ocorrer nas condições de transporte e armazenamento. A estabilidade de um perfume pode ser comprometida por um conjunto de fatores, que podem ser tanto intrínsecos, como extrínsecos à formulação<sup>40</sup>.

Os fatores extrínsecos estão relacionados com as condições de armazenamento a que o produto é sujeito, tanto durante o processo de produção, como durante o transporte e já em casa do consumidor final. Estes são os seguintes<sup>40</sup> :

**Tempo:** o envelhecimento de um perfume, como provado na maceração, leva à alteração das propriedades do mesmo. Estas alterações podem ser tanto a nível de características organoléticas, como físico-químicas e toxicológicas.

**Temperatura:** a exposição do perfume a mudanças de temperatura é extremamente comum, no entanto é difícil de controlar. Temperaturas elevadas tendem a acelerar a velocidade de reações químicas, que podem provocar alterações a nível da cor e odor de um perfume, por outro lado temperaturas baixas geram precipitações e turbidez no produto.

**Luz e Oxigénio:** os compostos que constituem os óleos essenciais num perfume são, por norma, muito reativos. A exposição de um perfume à radiação UV, aliada à presença de oxigénio, pode levar à oxidação destes compostos e formação de radicais livres. É crucial ter estes fatores em consideração, dado que as reações de oxidação-redução por eles provocada levam à degradação do perfume, alterando as suas características organoléticas.

**Material de acondicionamento:** antes de se iniciar a produção de um perfume é necessário garantir que todos os materiais com que este vai contactar são compatíveis com o produto. Designa-se material de acondicionamento tanto as cubas onde este é produzido e armazenado durante o período de maceração, como os frascos onde este será comercializado. Durante o processo de produção, os recipientes e materiais em contacto com o produto deverão ser de ácido inoxidável. Um perfume deverá ser vendido em frascos de vidro inerte, preferencialmente escuro de modo a evitar os processos referidos no ponto anterior.

**Microrganismos:** em perfumes formulados com elevada percentagem de álcool este fator pode ser desprezado, uma vez que não ocorre proliferação de microrganismos, todavia existem perfumes, especialmente de criança, que não contêm álcool. Nestes casos é necessário fazer avaliações microbiológicas, certificando que não estão presentes fungos ou bactérias.

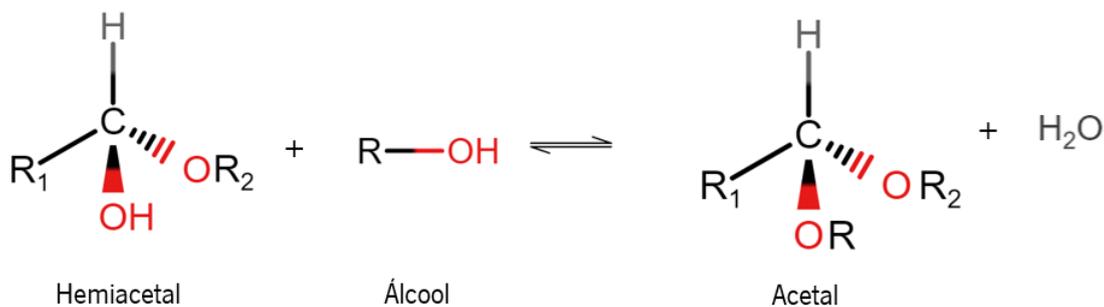
Os fatores intrínsecos que comprometem a estabilidade de um perfume estão relacionados com as interações que ocorrem entre os componentes da formulação, assim como interações entre o produto e o material de acondicionamento. Estes são os seguintes<sup>40</sup>:

**Incompatibilidade física:** é bastante comum em perfumaria a obtenção de produtos turvos aquando da adição da água, uma vez que os óleos essenciais são compostos apolares. Esta, no entanto, não é a única incompatibilidade física que se pode observar, podendo ocorrer precipitações, separação de fases, entre outros <sup>40</sup>.

### **Incompatibilidade química**

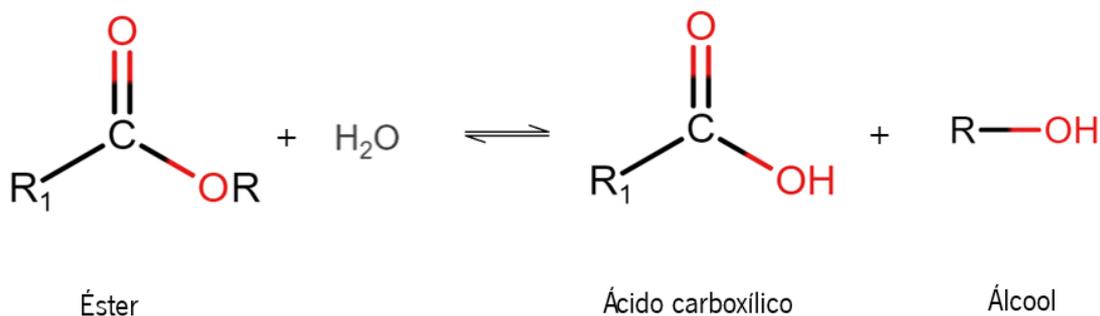
**Interações entre componentes da formulação:** um perfume pode ser formado por centenas de compostos e, como tal, a interação entre os ingredientes da formulação é inevitável. Certas reações são benéficas ao produto, como as descritas no tópico da maceração (2.9.1), porém outras reações são prejudiciais, podendo alterar ou anular a ação de determinados elementos da fragrância.

Os aldeídos, cetonas e ésteres, sendo os compostos com maior presença em perfumes, são também mais propensos a sofrer reações químicas indesejadas. Em meio ácido, um hemiacetal formado pela reação entre um aldeído e um álcool, atua como um álcool e, em reação com outro álcool irá formar um acetal, dando-se libertação de água<sup>29</sup>. A Figura 10 mostra de um modo generalizado estas reações:



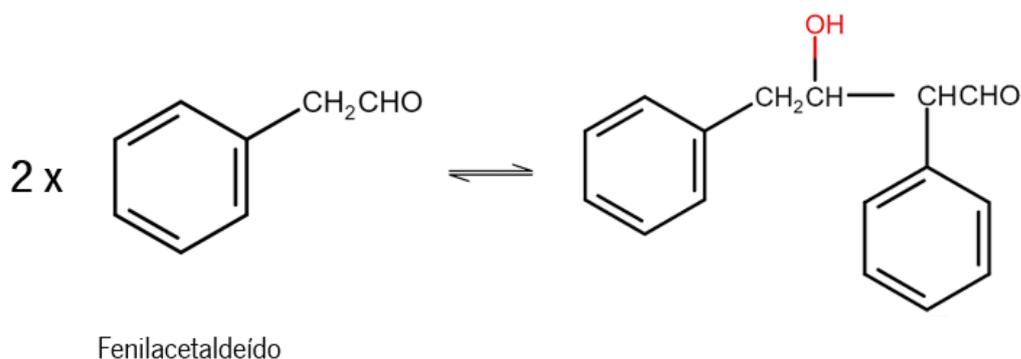
**Figura 10:** Reações de acetilação<sup>29</sup>.

A presença de água na formulação, assim como a sua formação nas reações descritas anteriormente pode levar à hidrólise de ésteres, compostos muito suscetíveis a esta reação. Assim, sob condições ácidas, um éster irá reagir com uma molécula de água, levando à formação de um ácido carboxílico e de um álcool, tal como representado na Figura 11<sup>23,29</sup>.



**Figura 11:** Reação de hidrólise ácida de um éster<sup>29</sup>.

Os compostos aldeídicos presentes nas essências, além de reações de acetilação benéficas à fragrância, estão sujeitos a sofrer reações aldolíticas, que podem ter um impacto negativo na mesma. O fenilacetaldéido é um composto que confere um odor verde às fragrâncias e é um exemplo deste tipo de reação, resultando na sua solidificação com o passar do tempo. Este fenómeno, representado na Figura 12, é justificado pela agregação de duas moléculas de fenilacetaldéido, dando origem a uma molécula de maiores dimensões<sup>23</sup>.



**Figura 12:** Reação aldólica do fenilacetaldéido<sup>23</sup>.

Apesar de se tratar de uma reação reversível, neste caso em particular o equilíbrio da reação favorece a molécula combinada, que pode ainda sofrer reações posteriores, levando à perda do aldeído e assim das notas verdes que este confere à fragrância<sup>23</sup>.

**Interações com o material de acondicionamento:** as interações entre o material de acondicionamento e os ingredientes da formulação podem gerar alterações quer a nível físico quer a nível químico. O armazenamento de fragrâncias em embalagens de plástico são um exemplo deste tipo de incompatibilidade, uma vez que a natureza dos materiais pode levar à migração de compostos da embalagem para o perfume. O mesmo se aplica a recipientes metálicos, especialmente de cobre ou ferro, cujos iões promovem oxidação dos óleos essenciais<sup>41</sup>.

Tendo em conta que todos estes fatores podem ter um impacto negativo na estabilidade de um perfume, é necessário recorrer a testes de modo a avaliar o seu impacto no produto final. É difícil prever com exatidão as alterações que podem ocorrer num perfume ao longo dos anos, no entanto é possível obter o perfil de estabilidade recorrendo a ensaios de estabilidade. Estes ensaios devem ser aplicados sempre que se pretende formular um novo produto, quando há alterações da formulação inicial da fragrância, do material de acondicionamento ou do processo de produção. A conjugação dos diferentes testes de estabilidade permite, para além de estimar o prazo de validade de um produto, a escolha do material de armazenamento mais adequado e ainda o aperfeiçoamento das formulações, que poderá permitir prolongar o seu tempo de vida. Os testes aplicados no desenvolvimento de um perfume são o teste de estabilidade preliminar, estabilidade acelerada e teste de prateleira<sup>40,42</sup>.

## **Estabilidade preliminar**

Este é o primeiro teste que se realiza no desenvolvimento de um novo produto e permite a triagem inicial das formulações. As diferentes formulações são submetidas a ciclos de condições extremas de temperatura, intercalando-se entre períodos na estufa e períodos no frigorífico ou congelador. O teste de estabilidade preliminar é de curta duração, sujeitando-se as amostras entre 6 a 8 ciclos. Apesar deste teste ser essencial na triagem de formulações, não permite estimar o tempo de vida das mesmas<sup>40</sup>.

## **Estabilidade acelerada**

Este teste permite prever o tempo de vida de um perfume, ou seja, o intervalo de tempo que este mantém as suas características estáveis. É ainda útil para avaliar a compatibilidade entre o produto e o material de acondicionamento, assumindo que os produtos em teste são representativos da versão final que será comercializada. Este ensaio é menos extremo que o teste de estabilidade preliminar, no entanto durante um período mais alargado. Por norma neste tipo de teste as amostras são submetidas a 90 dias a temperatura elevada, sendo que a escolha da temperatura está ao critério do responsável pelo ensaio. A temperatura deve ser tida em consideração, dado que um aumento de 10 °C irá duplicar a velocidade de ocorrência das reações. Assim, um mês em estufa a 50 °C vai equivaler a um ano à temperatura ambiente (25 °C). É ainda necessário ter em conta que nem todas as reações que ocorrem a 50 °C são possíveis de ocorrer à temperatura ambiente. Um produto que seja aprovado pelo teste de estabilidade acelerada considera-se apto para ser comercializado, enquanto que um produto que seja reprovado pode estar apto para venda ou não. Este teste pode ainda ser aplicado à estabilidade à radiação UV, colocando-se os frascos numa janela à luz, durante um período de algumas semanas ou até meses<sup>7</sup>.

## **Teste de prateleira (*Shelf life*)**

Este ensaio é aplicado com o objetivo de validar o prazo de validade estimado pelo teste de estabilidade acelerada. De modo a simular as condições a que o produto será mantido pelo cliente final, as amostras são mantidas nos frascos onde serão comercializados, nas condições normais do laboratório.

Todos estes testes são meramente preditivos, não garantindo na totalidade a estabilidade do perfume. Os resultados obtidos, apesar de não serem absolutos, oferecem uma elevada probabilidade de sucesso do produto<sup>43</sup>.

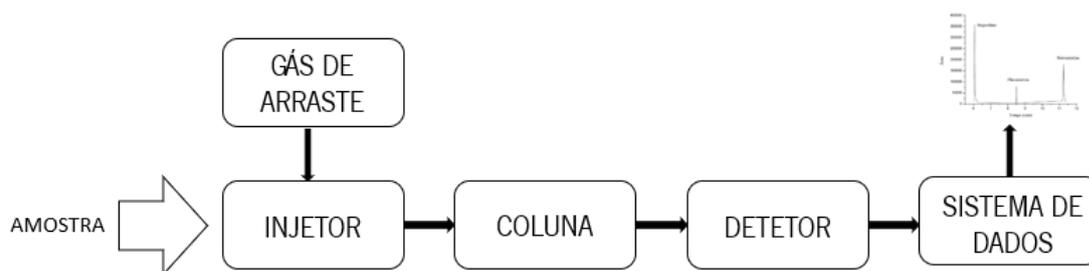
## 2.11. Métodos instrumentais para a análise de perfumes

Como em todas as indústrias, na perfumaria é imperativa a implementação de métodos instrumentais de análise que permitam a validação da conformidade dos produtos produzidos, assim como o auxílio no processo de desenvolvimento dos mesmos. Dada a natureza volátil dos perfumes, a cromatografia gasosa (GC) tornou-se a técnica eleita no que diz respeito à análise destes produtos, sendo normalmente acoplada à espectrometria de massa (MS) ou a um detetor de ionização de chama (FID)<sup>35</sup>.

A utilização destas técnicas possibilita a identificação de compostos voláteis presentes nas formulações, permitindo o estudo de estabilidade, assim como potenciais interações do produto com o material de acondicionamento ou com diversos substratos (ex: tecidos, cerâmicas, etc.), o que se torna crucial na avaliação da qualidade <sup>44,45</sup>. Este conjunto de técnicas ganhou grande destaque nas últimas décadas no domínio do desenvolvimento de novas fragrâncias e investigação de contratipos<sup>46,47</sup>.

### 2.11.1. Cromatografia Gasosa (GC)

A cromatografia gasosa é uma técnica cromatográfica de coluna, que permite a separação de compostos voláteis, mantendo a sua integridade. Em GC, a amostra é injetada no equipamento e arrastada por um gás inerte ao longo de uma coluna, onde se dá a separação dos diferentes compostos consoante a afinidade que estes têm com a mesma. De um modo geral um cromatógrafo gasoso é constituído por um injetor, uma coluna, um detetor e por fim um sistema de dados que permite gerar os cromatogramas<sup>48,49</sup>. A Figura 13 representa de um modo esquematizado a constituição típica de um cromatógrafo gasoso.



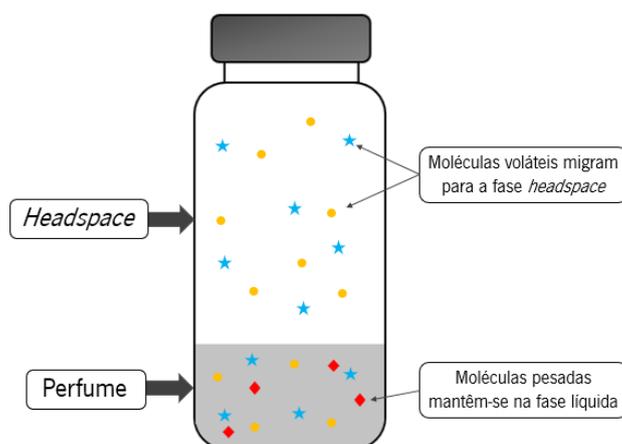
**Figura 13:** Representação esquemática que um cromatógrafo gasoso.

A fase móvel em cromatografia gasosa corresponde a um gás com a função de arrastar pela coluna os componentes da amostra em análise. Ao contrário de outros tipos de cromatografia, o gás de arraste deve ser quimicamente inerte, não interagindo nem com as moléculas do analito nem com a fase estacionária<sup>50</sup>. Os gases de arraste tipicamente utilizados em GC são o Hélio (He), o Nitrogénio (N<sub>2</sub>), e o Hidrogénio (H<sub>2</sub>)<sup>51</sup>.

A entrada da amostra na coluna é feita através de um sistema de injeção, que na maior parte dos casos se trata de uma seringa. Consoante a concentração da amostra e a capacidade da coluna do equipamento, a injeção será feita em modo *split* ou em modo *splitless*. No primeiro, apenas uma porção do volume injetado entra na coluna, sendo o restante desprezado através de uma válvula de saída. Este método aplica-se quando a concentração de soluto na amostra é superior a 0,1 %. Por outro lado, o modo *splitless* é aplicado quando estamos na presença de amostras com quantidades residuais de analito (<0,1 %). Neste caso, a válvula encontra-se fechada aquando da injeção, permitindo que a totalidade do volume injetado entre na coluna<sup>52</sup>.

Os perfumes são produtos muito complexos e nem sempre é de interesse analisar todos os seus compostos, uma vez que a nível olfativo apenas são perceptíveis moléculas que volatilizem em contacto com a pele. Em perfumaria recorre-se geralmente à técnica de amostragem por *headspace*, que consiste na extração dos compostos voláteis de uma matriz mais “pesada”, que poderá ser sólida ou um líquido não volátil. Assim, a amostra é inserida num *via*l de vidro selado, que irá sofrer um aumento de temperatura de modo a libertar as moléculas voláteis da matriz. As moléculas voláteis vão então passar

para o *headspace* enquanto que as não voláteis vão permanecer no fundo do *vial*. Desta forma é possível garantir que apenas as moléculas voláteis vão prosseguir para a coluna. Este processo encontra-se representado na Figura 14.



**Figura 14:** Representação do movimento das moléculas numa amostragem por *headspace*.

Este modo de operação, para além de reduzir o tempo de análise, impede que ocorram contaminações graduais da coluna por parte de compostos que sejam pouco ou nada voláteis<sup>53</sup>.

A fase estacionária (coluna) é o “coração” da cromatografia gasosa, responsável pelo processo de separação dos compostos da amostra em análise. A escolha da coluna mais indicada torna-se crucial, uma vez que vai influenciar a qualidade dos resultados obtidos. Em análise de óleos essenciais e fragrâncias denota-se um uso preferencial de colunas capilares<sup>54</sup>. Uma coluna capilar possui, por norma, um diâmetro de 0,25 mm e um comprimento que pode atingir mais de 100m. Colunas deste tipo tornam as análises mais eficientes, rápidas e com um volume de amostra muito reduzido<sup>49</sup>.

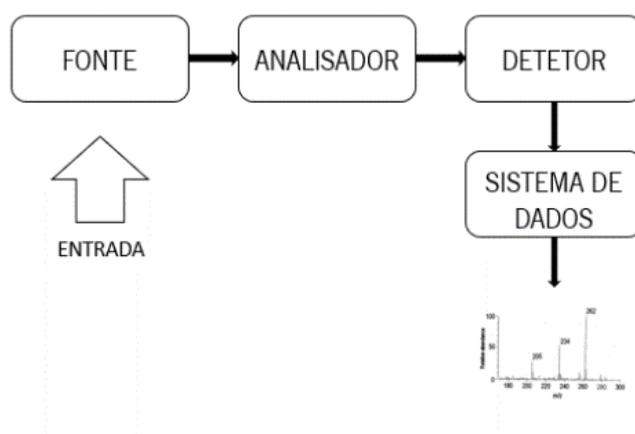
A separação dos analitos ao longo da coluna é feita consoante a afinidade que estes têm com a fase estacionária. O facto de a coluna estar contida num forno sujeito a um programa de temperaturas permite uma melhor separação dos componentes de uma mistura. Desta forma é possível obter a eluição dos diferentes analitos a diferentes tempos de retenção.

A eluição dos analitos juntamente com o gás de arraste vai permitir que estes passem sequencialmente por um detetor, que gerará um sinal elétrico proporcional à quantidade de analito. Este sinal vai permitir a construção de um cromatograma, que evidencia os diferentes componentes da amostra. Os

cromatogramas obtidos não permitem, no entanto, fazer a identificação dos analitos, sendo para isso necessário acoplar a cromatografia gasosa a outras técnicas de detecção, como a espectrometria de massa (MS).

## 2.11.2. Espectrometria de Massa (MS)

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica analítica de elevada relevância, que permite obter informações acerca de fórmulas e estruturas moleculares. Esta técnica tem por base a fragmentação das moléculas em análise em fragmentos sob a forma de iões, que irão ser separados consoante a sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Desta forma torna-se possível fazer uma análise qualitativa e quantitativa, tendo em conta a sua respetiva  $m/z$  e abundância<sup>55</sup>. Um espectrómetro de massa é composto por uma fonte de ionização, um analisador, um detetor e por fim um sistema de dados que irá gerar os espectros de massa. A Figura 15 representa esquematicamente a constituição de um espectrómetro de massa.

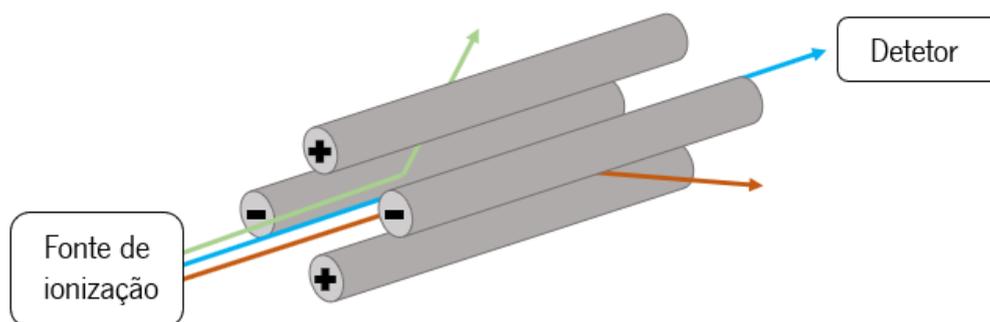


**Figura 15:** Representação esquemática de um espectrómetro de massa.

A ionização poder ser feita por diferentes métodos, que devem ser escolhidos tendo em conta a natureza da amostra a ser analisada. Sendo os perfumes constituídos por compostos orgânicos voláteis, a técnica de ionização mais adequada é por impacto eletrónico (EI). Neste método, as moléculas no estado gasoso são bombardeadas por um feixe de eletrões de elevada energia (70 eV) provenientes de um filamento

aquecido, que leva à perda de um elétron e, conseqüentemente à formação de um íon positivo radicalar. As cargas negativas e neutras geradas vão ser atraídas pelo *repeller* e excluídas pelo sistema de vácuo enquanto que as positivas são direcionadas para o analisador<sup>56</sup>.

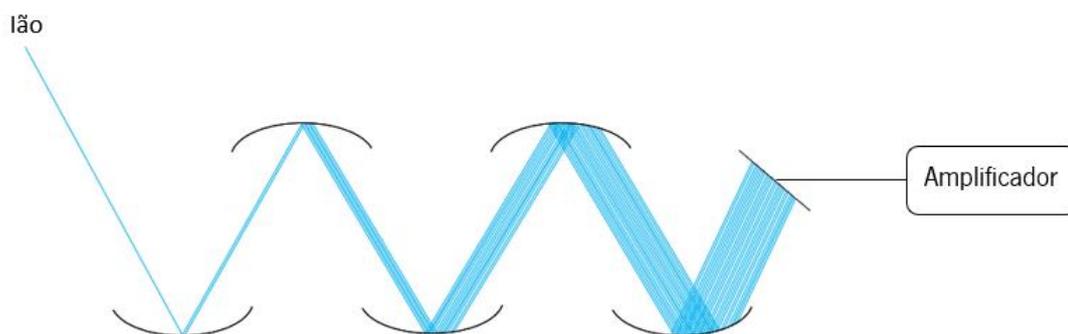
Um dos analisadores mais comumente empregues é o quadrupolo. Este tipo de analisador consiste em quatro polos, de polaridade alternada, dispersos paralelamente. Assim, polos opostos têm a mesma polaridade enquanto que polos adjacentes têm polaridade oposta, como mostra a Figura 16.



**Figura 16:** Representação esquemática que um analisador do tipo quadrupolo.

Os íons que são direcionados para o analisador, vindos da fonte de ionização, ficam sob o efeito de um campo magnético e de uma determinada radiofrequência, aplicados pelos polos. Íons de uma certa massa vão adotar uma trajetória oscilatória estável, permitindo que atravessem o analisador em direção ao detetor. Todos os íons de massas diferentes serão incapazes de manter uma trajetória estável e acabam por colidir com um dos polos, sendo que desta forma não atingem o detetor<sup>57</sup>. Um espectro de massas é obtido fazendo variar a componente de corrente direta e a radiofrequência, alternando desta forma os íons a ser separados no analisador.

O detetor em MS tem como função detectar todos os íons que a ele chegam, da massa separada pelo analisador. O tipo de detetor mais utilizado em MS é o multiplicador de elétrons, que permite obter mais de um milhão de elétrons a partir de um único íon. O princípio desta técnica baseia-se no conceito de emissão secundária, onde um eletrodo no vácuo (dínodo), com potencial negativo, emite elétrons quando um íon com energia cinética suficiente embate sobre ele. Os elétrons gerados por emissão secundária vão embater no dínodo seguinte, amplificando a cada passo o número de elétrons secundários<sup>58</sup>. O funcionamento de um multiplicador de elétrons encontra-se esquematizado na Figura 17.



**Figura 17:** Representação esquemática que um detector do tipo multiplicador de elétrons.

Após a amplificação do sinal, este é enviado para um sistema de dados que irá gerar um espectro. O espectro obtido representa a abundância relativa (%) em função da razão massa/carga ( $m/z$ ) e é uma “impressão digital” dos compostos em análise, sendo que cada composto vai ter o seu respectivo espectro. A identificação de compostos, quer conhecidos quer desconhecidos, pode ser feita em conjugação com outras técnicas analíticas, como a ressonância magnética nuclear (NMR). Atualmente existem bibliotecas espectrais extremamente vastas, que facilitam o processo de identificação.

### 2.11.3. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

Quando se pretende analisar um composto único, a entrada no espectrômetro de massa é feita por injeção direta, no entanto quando se trata de uma mistura de compostos é necessário proceder-se a uma separação prévia. Esta separação é feita através de métodos cromatográficos, podendo recorrer-se a cromatografia líquida (LC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia de fluido supercrítico (SFC) ou eletroforese capilar (CE).

No decorrer da presente dissertação foi utilizada a espectrometria de massa foi acoplada a cromatografia gasosa, técnica ideal para análise de perfumes. Desta forma, os compostos que eluem da coluna do GC

entram na câmara de ionização do MS e procedem para a respetiva análise de massas<sup>5</sup>. O acoplamento destas duas técnicas permite um grau de identificação dos compostos muito mais preciso do que qualquer uma das técnicas aplicada separadamente.

Certas limitações podem ser ultrapassadas no acoplamento destas técnicas. A cromatografia gasosa utilizada separadamente pode gerar dados dúbios, uma vez que apenas são analisados os tempos de retenção dos analitos. A identificação de compostos por este método pode levar a ambiguidades, especialmente na ocorrência de co-eluição.

## Capítulo 3 - Parte experimental

### 3.1. Material

O material de vidro utilizado na preparação das amostras, assim como durante as análises encontra-se descrito na Tabela 2.

**Tabela 2:** Características dos materiais de vidro utilizados.

Material	Capacidade
Gobelé	100 mL
	250 mL
Pipeta graduada	50,0 ± 0,2 mL
Proveta	250 ± 1 mL
Fracos shot	100 mL
	250 mL
Funil	50 mm
	100 mm
Placa de Petri	-

Para além do material de vidro foram ainda utilizados magnetes, pompets e filtros de papel.

### 3.2. Instrumentação

As análises das amostras, assim como os próprios procedimentos de estabilidade e maceração, requeriram o uso de diversos equipamentos, indicados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Características dos equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca e Modelo	Incerteza
Eléctrodo pH combinado	Mettler Toledo LE409	$\pm 0,01$ pH
Conduvímetero 0 - 200.0 $\mu$ S		$\pm 0,1$ $\mu$ S
Termómetro	Lovibond SensoDirect 150	$\pm 0.1$ °C
Medidor de pH, condutividade e temperatura		-
Refratómetro 1.3306 - 1.5284	Atago PAL-RI	$\pm 0.00003$
Micropipeta 10 - 100 $\mu$ L	Easy 40 Elite	$\pm 1,0$ $\mu$ L
Picnómetro 10mL	Labbox	-
Densímetro	Alla France	$\pm 0,1$ g/mL
Alcoolómetro de vidro 80 - 90%	Alla France	$\pm 0,1$ %
Balança semi-analítica	Kern PFB 3000 - 2	$\pm 0,01$ g
Estufa	JP Selecta 2001259	$\pm 2$ % da temperatura
Arca frigorífica	Centaurus MT - 4E2 / 9	-
Frigorífico	Electrolux ER8302C	-
Cromatógrafo de gás acoplado a detetor de massa	Perkin - Elmer GC: Clarus® 680 MS: Clarus® SQ 8T Headspace: TurboMatrix HS 40 trap	-

### 3.3. Condições de análise e funcionamento do equipamento

#### GC-MS

O equipamento utilizado no decorrer do estágio para as análises de GC-MS encontra-se representado na **Figura 18**: Equipamento utilizado nas análises de GC-MS. Figura 18 é constituído pelo sistema de *headspace* (TurboMatrix HS 40 Trap), pelo cromatógrafo gasoso (Clarus® 680), pelo sistema de *splitting* (S-Swafer™) e pelo espectrômetro de massa (Clarus® SQ 8T).



**Figura 18:** Equipamento utilizado nas análises de GC-MS.

As condições de análise do sistema de *headspace*, do GC e do MS encontram-se compiladas nas Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6 , respetivamente.

**Tabela 4:** Condições de análise do *headspace*.

Condições de análise do <i>headspace</i>	
Equilíbrio do vial	80 °C durante 15 minutos
Agulha	120 °C
Linha de transferência	140 °C, coluna ligada diretamente ao HS Trap
Gás de arraste	Hélio a 25 psig
Purga seca	5 minutos
Trap	30 °C a 300 °C, 5 minutos de retenção
Ciclos de extração	1 ciclo com pressão de injeção de 40 psig

**Tabela 5:** Condições de análise do GC.

Condições de análise do GC	
Coluna	60 m x 0,32 mm x 1,0 $\mu$ Elite-5MS diretamente ligada ao HS Trap
Forno	2 minutos a 40 °C, aumento a 4 °C/min até aos 240 °C e retenção por 8 minutos
Gás de arraste	13 psig no Swafer
Injetor	PSS a 300 °C, gás de arraste desligado

**Tabela 6:** Condições de análise do MS.

Condições de análise do MS	
Gama de análise	m/z 35 a 350
Tempo de análise	0,8 s
Tempo de inserção	0,1 s
Temperatura da fonte	250 °C
Temperatura da linha de entrada	250 °C

### 3.4. Técnicas analíticas aplicadas à análise de perfumes

Em todos os passos do processo de produção de um perfume, este é submetido a análises físico-químicas de modo a garantir a conformidade do produto. Estas análises passam pela medição do pH, da condutividade, da densidade, do índice de refração e do teor alcoólico. São ainda feitas avaliações às características organoléticas, nomeadamente a cor, o odor e aspeto geral do perfume.

Estas técnicas são ainda empregues no desenvolvimento do produto e foram aplicadas aos ensaios de estabilidade e de maceração realizados.

#### 3.4.1. Medição do pH

A determinação dos valores de pH dos perfumes em estudo foi feita recorrendo ao elétrico disponível no laboratório, seguindo os protocolos implementados pela Nortempresa. Antes da sua utilização era efetuada a calibração do equipamento, recorrendo a duas soluções tampão de pH 4,01 e 7,00.

Previamente às medições do pH, era necessário garantir a limpeza do elétrico e, para tal, procedia-se a lavagem do mesmo com água desionizada. As medições do pH eram realizadas mergulhando o elétrico nas soluções em análise, sendo estas soluções tampão ou os próprios perfumes. As análises dos perfumes eram realizadas sob agitação. Os valores do pH das soluções em análise eram obtidos após um período de estabilização, depois do qual se procedia a uma nova lavagem do elétrico.

Dado que os perfumes têm uma base oleosa, a lavagem do elétrico após a sua utilização era feita com água desionizada e álcool etílico. Por fim o elétrico era armazenado numa solução tampão de pH 7,00.

A avaliação deste parâmetro foi crucial nos ensaios de estabilidade, uma vez que a literatura indica que uma amostra se considera estável se a percentagem de variação deste parâmetro for inferior a 25 %<sup>59</sup>. Assim, no tratamento dos resultados obtidos por esta técnica, recorreu-se à Equação 1 para determinar a percentagem de variação do pH.

$$\text{variação pH (\%)} = \frac{\bar{x} - x_{t0}}{x_{t0}} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde  $x_{t0}$  corresponde ao valor de pH inicial e  $\bar{x}$  ao valor médio de pH da análise.

### 3.4.2. Medição da condutividade

A determinação da condutividade dos perfumes foi realizada de forma idêntica à medição do pH. Antes da utilização do condutímetro era necessário garantir a limpeza da célula de condutividade, enxaguando-se com água desionizada. A calibração do equipamento era realizada regularmente recorrendo a uma solução padrão de condutividade conhecida.

A medição da condutividade dos perfumes era feita sob agitação, garantindo a homogeneidade da amostra. A célula de condutividade era mergulhada na solução e era feita a leitura da sua condutividade, sendo necessário um breve período de estabilização do valor. Após a sua utilização, a célula era lavada com água desionizada e álcool etílico.

O tratamento dos resultados obtidos para este parâmetro nos ensaios de estabilidade foi feito avaliando a variação do mesmo. Assim, foi aplicada a Equação 2.

$$\Delta x = |x_{amostra} - x_{controlo}| \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde  $x_{amostra}$  corresponde ao valor do parâmetro em questão obtido para uma amostra e  $x_{controlo}$  ao valor obtido para o respetivo controlo.

### 3.4.3. Medição da densidade

A determinação da densidade dos perfumes foi feita recorrendo a dois métodos distintos, sendo a escolha do método feita tendo em conta o volume de líquido disponível. Nos ensaios de estabilidade em que foram utilizados os frascos onde os perfumes são comercializados, uma vez que têm volume reduzido, foi utilizado o método do picnómetro. Por outro lado, quando o volume em causa era suficiente ( $\geq 250$  mL), o método de eleição era o do hidrómetro, pela sua praticidade.

Independentemente do método utilizado, era necessário garantir que a temperatura das soluções em análise se encontrava a 20 °C, uma vez que a densidade é um parâmetro extremamente influenciado pela temperatura.

O método do picnómetro em líquidos consiste na determinação da massa de um volume conhecido de amostra. Assim, o primeiro passo na análise de densidade por este método era medir a massa do picnómetro vazio. O picnómetro era então cheio até ao limite com a solução a analisar, inserindo-se seguidamente a tampa, garantido que não havia a formação de bolhas de ar no seu interior. O equipamento era posteriormente seco e procedia-se novamente à determinação da sua massa. O valor da densidade era obtido recorrendo à Equação 3.

$$\text{densidade } (\rho) = \frac{m_2 - m_1}{V} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde  $m_1$  corresponde à massa (em gramas) do picnómetro vazio,  $m_2$  à massa (em gramas) do picnómetro cheio com a solução em análise e  $V$  ao volume (em mililitros) do picnómetro.

O volume em questão varia consoante o picnómetro em uso, sendo o equipamento utilizado certificado, e cujo volume se encontra gravado no próprio vidro. Após a análise, o picnómetro era esvaziado e procedia-se à sua lavagem com água abundante e álcool etílico.

O método do hidrómetro é um método de flutuação que permite análises rápidas e exatas, trazendo ainda a vantagem da fácil lavagem do equipamento. A determinação da densidade por este método foi feita com recurso a provetas de 250 mL, onde o perfume era colocado. O hidrómetro de densidade era mergulhado na solução, certificando que este não tocava nas paredes da proveta e que não eram formadas bolhas de ar nas paredes do próprio densímetro. A leitura da densidade era feita duas vezes

de modo a garantir a validade dos resultados. Após a determinação da densidade da solução em análise, o densímetro era lavado com água abundante e enxaguado com etanol.

Para avaliar este parâmetro nos ensaios de estabilidade foi considerada a sua variação, aplicando a Equação 2.

#### 3.4.4. Medição do teor alcoólico

A medição do teor alcoólico foi realizada recorrendo também ao método do hidrómetro, neste caso utilizando um alcoolómetro de vidro. À semelhança do método do densímetro abordado anteriormente, a determinação do teor alcoólico dos perfumes foi realizada com recurso a provetas de 250 mL. O alcoolómetro era mergulhado na solução de modo a que não estivesse em contacto com as paredes da proveta e certificando a ausência de bolhas de ar. A leitura do teor alcoólico era realizada em duplicado de modo a garantir a validade dos resultados. Após a leitura do teor alcoólico, o alcoolómetro era lavado com água abundante e enxaguado com etanol. De salientar que este parâmetro é igualmente influenciado pela temperatura, sendo imperativo garantir que as amostras em análise se encontravam a 20 °C.

#### 3.4.5. Medição do índice de refração

A determinação do índice de refração dos perfumes foi realizada com recurso a um refratómetro digital, que permite análises simples e rápidas. O primeiro passo na utilização do refratómetro é a calibração do instrumento, sendo utilizada água desionizada como branco. Após o descarte da água e limpeza do instrumento, eram colocados cerca de 300 µL da amostra a analisar no prisma. A leitura do índice de refração era feita diversas vezes, até que o valor estabilizasse por, pelo menos, três leituras.

A lavagem do refratómetro era feita com água abundante e álcool etílico, sendo o instrumento limpo cuidadosamente com um papel, de modo a não danificar o prisma.

### 3.4.6. Avaliação das características organoléticas

A avaliação das características organoléticas é o método de análise mais subjetivo aplicado aos perfumes, no entanto é um dos mais relevantes. As características avaliadas ao longo dos ensaios de estabilidade e maceração foram o odor, a cor e o aspeto geral do perfume, nomeadamente a ocorrência de precipitações, o aparecimento de partículas, etc.

De modo a padronizar estas análises, durante os ensaios de estabilidade, os controlos foram armazenados em refrigeração, para que não ocorressem variações ao nível das suas características. Estes controlos permitiram avaliar a ocorrência de alterações quer ao nível do odor quer ao nível da cor das amostras submetidas às diferentes condições. Apesar de ser impossível eliminar o fator de subjetividade, as avaliações foram realizadas pelo mesmo indivíduo, permitindo análises mais coerentes.

Não foi possível seguir o mesmo protocolo no caso dos ensaios de maceração, sendo necessário recorrer à memória sensorial na avaliação das características da cor e odor dos perfumes.

### 3.5. Seleção de amostras

As amostras para os ensaios de estabilidade, assim como para o estudo da maceração, foram selecionadas tendo por base as suas características olfativas, de modo a que os estudos abrangessem uma vasta variedade de perfis olfativos. Esta seleção foi ainda o reflexo das produções realizadas nos períodos designados para os respetivos ensaios.

As amostras em estudo foram codificadas, sendo que o código “E” remete para ensaios de estabilidade e o código “M” para os estudos de maceração. As amostras sujeitas a ensaios de estabilidade e maceração, e as suas respetivas características olfativas, encontram-se descritas na

Tabela 7 e Tabela 8, respetivamente.

**Tabela 7:** Amostras utilizadas nos estudos de estabilidade e respetivos perfis olfativos.

<b>Amostras</b>	<b>Perfil olfativo</b>
E1	Oriental Floral
E2	Aromático Especiado
E3	Floral Frutado Gourmand
E4	Aquático Amadeirado
E5	Especiado Cítrico
E6	Oriental Doce
E7	Oriental Baunilha
E8	Amadeirado Especiado

**Tabela 8:** Amostras utilizadas nos estudos de maceração e respetivos perfis olfativos.

<b>Amostra</b>	<b>Perfil olfativo</b>
M1	Chypre Floral
M2	Aquático Amadeirado
M3	Aromático Aquático
M4	Chypre Floral
M5	Floral Frutado
M6	Oriental Fougère
M7	Oriental Baunilha
M8	Oriental Floral

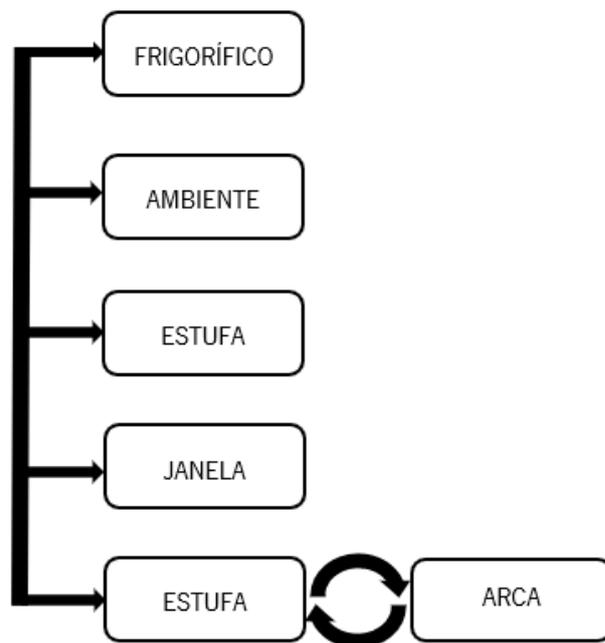
### 3.6. Protocolo de avaliação de estabilidade

De modo a avaliar a estabilidade dos perfumes em estudo, foram aplicados testes de estabilidade preliminar, de estabilidade acelerada e testes de prateleira, sendo que os últimos, pela sua prolongada duração, não terminaram no decorrer do estágio. Em Portugal a entidade reguladora de produtos cosméticos é a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), no entanto esta não estabelece protocolos padrão para o estudo e controlo dos mesmos. Posto isto, os protocolos de estabilidade foram estabelecidos tendo por base as diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agência reguladora responsável pelo controlo dos produtos cosméticos, entre outros, no Brasil.

Dado que os testes aplicados permitem não só avaliar a estabilidade dos perfumes, mas também possíveis incompatibilidades com o material de acondicionamento, devem ser realizados nos respetivos frascos em que os perfumes são comercializados. Isto foi aplicado nas amostras E1 - E5, sendo que os ensaios do perfume E6, pelo reduzido volume, foram realizados em frascos de laboratório. Os ensaios de controlo, para todas as amostras, por uma questão de praticidade, foram realizados em frascos do tipo shot de 250 mL.

Após a seleção das amostras para estudo, procedeu-se à distribuição das mesmas pelos frascos. Para as amostras de E1 – E5, de modo a abranger a total variedade de material de armazenamento existente para os produtos em questão, foram utilizados frascos opacos de 40, 70 e 100 mL. Assim, os frascos foram preenchidos até 2/3 do seu volume e, em duplicata, colocados nas diferentes condições de armazenamento, ilustradas na Figura 19.

Por sua vez, as amostras de E6 foram colocadas em frascos de laboratório transparentes, à semelhança dos utilizados na sua comercialização. O facto de se tratar de frascos transparentes acrescenta um fator extra aos ensaios de estabilidade acelerada, tornando-se necessária a avaliação do impacto da radiação UV.



**Figura 19:** Distribuição das amostras pelas diferentes condições de armazenamento.

Para que se pudesse estabelecer um ponto de comparação foi necessário fixar um padrão (controlo), que consistiu numa amostra armazenada no frigorífico a aproximadamente 4°C para que estivesse desprovido de fatores que pudessem comprometer a sua estabilidade (temperatura elevada e luz). Este padrão foi utilizado tanto para os testes de estabilidade preliminar como acelerada e permitiu não só fazer uma comparação dos parâmetros físico-químicos, mas também das características organoléticas.

O teste de estabilidade preliminar foi realizado submetendo as amostras a ciclos de condições extremas de temperatura. Para tal, as amostras foram colocadas durante 24 h na estufa a  $43 \pm 2$  °C seguidas de 24h na arca frigorífica a  $2 \pm 2$  °C, repetindo-se o procedimento num total de 6 ciclos. As avaliações físico-químicas, nomeadamente a medição do pH, da condutividade e da densidade, e as organoléticas foram realizadas pré-ensaio, após 3 ciclos e após os 6 ciclos totais.

Para a realização dos ensaios de estabilidade acelerada, as amostras foram submetidas a um período de 90 dias na estufa a  $43 \pm 2$  °C. No caso das amostras de E6, armazenadas em frascos transparentes, foi ainda necessário colocar amostras numa janela durante um período de duas semanas para que estivessem expostas à luz solar. Após esse período as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente, num local escuro. Tal como nos testes de estabilidade preliminar, foram medidos os valores

de pH, condutividade e densidade, assim como avaliações organoléticas, realizando-se análises semanais ao longo dos 3 meses.

Os resultados obtidos pela aplicação de testes de estabilidade acelerada não são absolutos, tratando-se de respostas meramente preditivas, no entanto a probabilidade de sucesso é elevada. Quanto mais as condições avaliadas nos ensaios de estabilidade se aproximarem das condições a que o produto poderá ser submetido no mercado, maiores as probabilidades de se obter resultados fidedignos. Esta aproximação das condições “reais” traduz-se na aplicação de condições menos extremas e, conseqüentemente, numa maior duração dos testes aplicados, sendo o teste de prateleira o ensaio mais representativo.

Assim, foram realizados em paralelo, testes de prateleira, que consistiram em armazenar as amostras no ambiente do laboratório, de modo a simular as condições a que um perfume pode ser submetido nas mãos do consumidor final. As amostras foram sujeitas às normais variações de temperatura e expostas a luz artificial ao longo de todo o período de estudo. Os valores de pH, condutividade e densidade, assim como as características organoléticas, foram acompanhados mensalmente de modo a aferir a conformidade do produto ao longo do tempo.

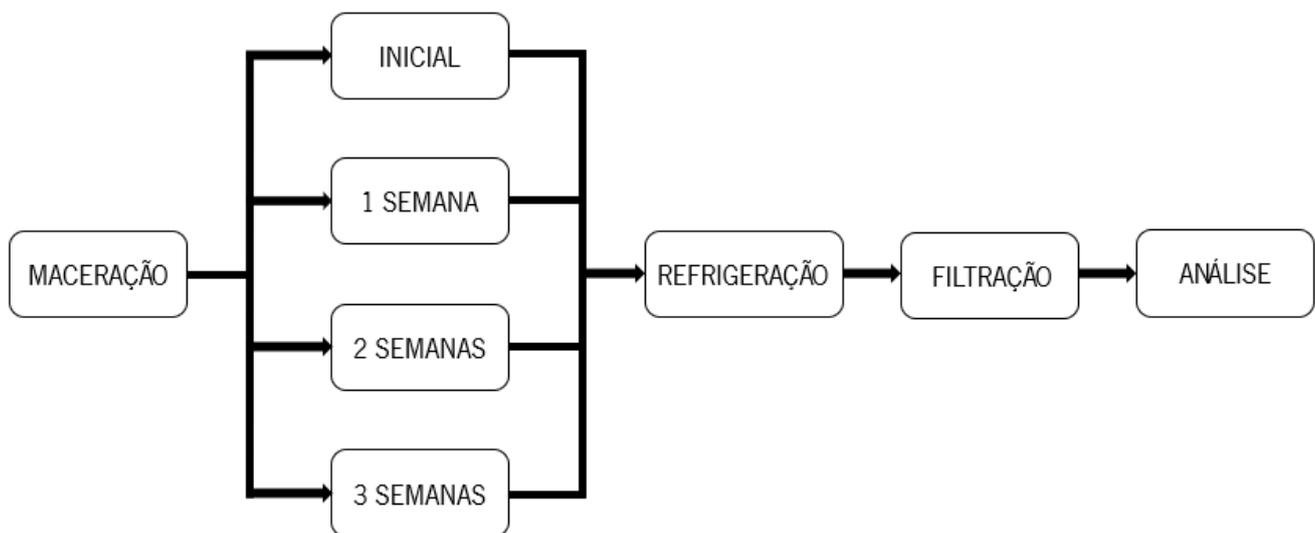
Após o período de vencimento, ou seja, o período estimado como prazo de validade, o produto submetido aos testes de prateleira deveria ser reavaliado de modo a validar esta estimativa dada pelos ensaios de estabilidade acelerada. Esta avaliação permitiria aumentar o prazo de validade caso o produto se apresentasse conforme ou, pelo contrário, diminuí-lo caso o produto apresentasse notórias perdas de qualidade.

### 3.7. Protocolo de maceração

Sendo um dos objetivos deste projeto minimizar os custos associados à maceração, dado que se trata de um processo prolongado de modo a garantir a total maceração do perfume, é de interesse identificar o ponto a partir do qual o produto atinge as propriedades desejadas.

Sendo que o normal período de maceração corresponde a 3 semanas à temperatura ambiente ( $20 \pm 3$  °C), foi avaliada a maceração dos perfumes após 1 e 2 semanas, de modo a avaliar se a redução deste período seria viável. A filtração dos perfumes sucede a maceração e, para tal, é necessário submetê-los a um período de refrigeração com o intuito de precipitar potenciais compostos ceratos presentes.

Com isto em mente, foram monitorizados 3 perfumes ao longo dos 3 graus de maceração, sendo ainda avaliadas as suas propriedades imediatamente após a produção. A recolha das amostras a analisar foi feita diretamente das cubas onde os perfumes são produzidos e macerados, as quais foram submetidas a um período de 24h de refrigeração e posterior filtração. O processo aplicado encontra-se representado na Figura 20.



**Figura 20:** Diagrama do procedimento de maceração adotado.

A análise dos perfumes em diferentes graus de maceração consistiu na avaliação do seu pH, condutividade, densidade, índice de refração, teor alcoólico e características organolépticas, nomeadamente cor e odor.

## Capítulo 4 – Resultados e discussão

No presente capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos nos ensaios de estabilidade e maceração. Os dados obtidos são ainda correlacionados, interpretados e discutidos de modo a contribuir para uma melhor compreensão dos fenómenos que ocorreram nos perfumes ao longo do tempo.

### 4.1. Estabilidade

No total foram estudados seis perfumes quanto à sua estabilidade, sendo submetidos a testes de estabilidade preliminar, estabilidade acelerada e testes de prateleira. Dado que os testes de prateleira são ensaios prolongados, o seu término não foi possível no decorrer do estágio. Os dados recolhidos neste teste são apenas referentes a seis meses de estudo, não permitindo tirar conclusões relevantes, pelo que não serão apresentados nem discutidos.

A correlação de diversos métodos físico-químicos de análise, aliados a análises organoléticas possibilitam elucidar acerca da estabilidade de um produto, permitindo ainda estabelecer limites de aceitação do mesmo. Nos testes de estabilidade foi avaliada a variação do pH, da condutividade e da densidade. Em fragrâncias, o pH é um parâmetro cuja variação é frequente ao longo do tempo, no entanto para que um perfume seja considerado estável, essa variação não deve ser significativa. Em testes de estabilidade uma amostra considera-se aprovada quando a percentagem de variação máxima do seu valor de pH, em relação ao valor inicial ( $t_0$ ), é inferior a 25%<sup>99</sup>.

A condutividade de uma fragrância é uma característica intrínseca à sua formulação, sendo que não existem valores fixos para esta variável, no entanto uma variação na condutividade pode revelar a ocorrência de reações químicas prejudiciais ao perfume. Uma elevada condutividade pode ainda ser explicada por impurezas contidas na água utilizada na produção do perfume.

A densidade de uma fragrância é um parâmetro dependente do tipo de produto em questão, ou seja, da concentração de essência utilizada, sendo que não deverá sofrer alterações consideráveis.

### 4.1.1. Estabilidade preliminar

Os diversos parâmetros foram monitorizados durante os estudos de estabilidade preliminar, permitindo obter intervalos de valores de cada parâmetro para cada amostra, assim como variações máximas, em relação a t0 e aos próprios controlos (Tabela 9). As representações gráficas referentes aos resultados obtidos para os diferentes parâmetros ao longo dos ensaios de estabilidade preliminar podem ser consultadas no Anexo I (Figura 27, Figura 28, Figura 29, Figura 30, Figura 31 e Figura 32).

**Tabela 9:** Intervalos de valores obtidos para pH, condutividade e densidade, e variações máximas para cada parâmetro nos ensaios de estabilidade preliminar.

	pH	$\Delta$ pH máx. (%)	Condutividade ( $\mu$ S)	$\Delta$ condutividade máx. ( $\mu$ S)	Densidade (g/mL)	$\Delta$ densidade máx. (g/mL)
E1	7,49 – 7,61	- 1,5	9,6 – 13,0	2,9	0,843 – 0,855	0,003
E2	5,67 – 6,24	9,5	1,1 – 3,6	2,2	0,842 – 0,853	0,008
E3	5,72 – 6,05	4,7	0,6 – 2,8	1,9	0,843 – 0,853	0,009
E4	6,08 – 6,30	1,8	0,7 – 2,0	1,1	0,843 – 0,844	0,001
E5	6,56 – 7,20	7,0	0,4 – 4,7	3,2	0,837 – 0,845	0,004
E6	6,23 – 6,26	- 0,5	4,6 – 5,6	1,2	0,856 – 0,858	0,002

Os resultados obtidos evidenciam que há variação nos valores de pH das amostras em estudo relativamente a t0, no entanto é possível aferir a variação em todas as amostras se encontra dentro do limite estabelecido de 25 %, sendo a variação máxima verificada de aproximadamente 9,5 %, na amostra E2.

Os óleos essenciais, por norma, não são bons condutores de corrente elétrica, sendo a condutividade dos perfumes em estudo na ordem dos  $\mu$ S (microsiemens). Nos estudos de estabilidade preliminar observou-se um aumento gradual da condutividade em todas as amostras, sendo o aumento mais significativo de 3,2  $\mu$ S na amostra E5. O aumento de condutividade verificado indica a ocorrência de reações de ionização ou dissociação, dado que espécies dissociadas são mais condutoras que espécies na forma molecular<sup>60</sup>.

É possível observar que na maioria das amostras em análise se verificou um aumento do valor da densidade, no entanto o mesmo pode ser verificado nos controlos. Por norma um aumento na densidade de um perfume indica a perda de compostos voláteis, sendo os compostos de maior volatilidade, nomeadamente o etanol e notas de saída, mas propensos a dissipar<sup>40</sup>. As variações observadas entre as amostras submetidas aos ciclos e os seus controlos são pouco expressivas o que indica que, em termos de densidade, os perfumes são estáveis a variações drásticas de temperatura.

A atração que um indivíduo sente por um perfume é baseada nas suas características organoléticas, sendo estas a cor e o odor. A avaliação destas propriedades torna-se crucial, sendo vantajoso para o produtor mantê-las estáveis por um período alargado de tempo. Apesar das análises realizadas a estas propriedades serem subjetivas, podem ser úteis na perceção dos efeitos que os fatores aplicados têm no produto. A Tabela 10 sumariza os resultados obtidos a meio do estudo e no final.

**Tabela 10:** Avaliação das características organoléticas das amostras ao longo dos três e seis ciclos de análise.

	Ciclo 3		Ciclo 6	
	cor	odor	cor	odor
<b>E1</b>	NA	NA	LA	LA
<b>E2</b>	NA	NA	LA	LA
<b>E3</b>	NA	NA	NA	NA
<b>E4</b>	NA	NA	NA	NA
<b>E5</b>	NA	NA	NA	NA
<b>E6</b>	NA	NA	NA	NA

Legenda: NA- não alterado; LA—ligeiramente alterado

De um modo geral não houve alterações relevantes nas propriedades organoléticas dos perfumes, à exceção das amostras E1 e E2, que apresentaram um ligeiro escurecimento da sua coloração e uma leve intensificação do seu odor. A intensificação do odor vai de encontro com o aumento de densidade observado, uma vez que esta se deve à perda dos produtos mais voláteis, nomeadamente o etanol e algumas notas de saída, alterando assim as características do perfume.

Posto isto, as amostras consideram-se aptas, sendo necessário ainda um estudo de estabilidade acelerada das mesmas de modo a prever o seu prazo de validade e avaliar a compatibilidade entre o produto e o material de acondicionamento.

#### 4.1.2. Estabilidade acelerada

Uma vez que os ensaios de estabilidade preliminar são apenas um método de triagem inicial das formulações, é de interesse a posterior predição e verificação da sua estabilidade ao longo do tempo. Tal como nos testes de estabilidade preliminar, os ensaios de estabilidade acelerada permitiram a obtenção de intervalos de valores para cada parâmetro, assim como variações máximas dos mesmos, e encontram-se sumarizados na Tabela 11. As representações gráficas referentes aos resultados obtidos para os diferentes parâmetros ao longo dos ensaios de estabilidade acelerada podem ser consultadas no Anexo I (Figura 27, Figura 28, Figura 29, Figura 30, Figura 31 e Figura 32).

De notar que os resultados apresentados são referentes a 3 meses de ensaio no caso das amostras E1 – E5, e a 2 meses no caso da amostra E6. Este facto deve-se ao facto de se tratarem de ensaios prolongados, cuja conclusão não foi possível no decorrer do estágio.

**Tabela 11:** Intervalos de valores obtidos para pH, condutividade e densidade, e variações máximas para cada parâmetro nos ensaios de estabilidade acelerada.

	pH	$\Delta$ pH máx. (%)	Condutividade ( $\mu$ S)	$\Delta$ condutividade máx. ( $\mu$ S)	Densidade (g/mL)	$\Delta$ densidade máx. (g/mL)
E1	6,84 - 7,63	-10,0	10,0 – 19,3	9,2	0,842 – 0,897	0,054
E2	5,67 - 6,25	10,1	1,1 – 6,9	5,7	0,842 – 0,878	0,036
E3	4,48 - 7,01	21,5	0,6 – 7,6	7,0	0,843 – 0,876	0,033
E4	6,04 - 6,47	6,3	0,7 – 6,6	5,4	0,840 – 0,881	0,037
E5	6,52 - 7,60	10,2	0,4 – 6,8	6,4	0,835 – 0,874	0,014
E6	6,06– 6,29	-3,2	4,6 – 6,4	1,8	0,857 – 0,859	0,001

Tendo em conta o objetivo deste teste, é imperativo correlacionar os valores obtidos pelas análises físico-químicas com análises organoléticas, de modo a permitir verificar a partir de que ponto ocorreram alterações significativas no produto. A Tabela 12 indica, para cada amostra, os dias em que foi verificado que o produto se encontrava ligeiramente alterado (LA) e muito alterado (MA), tanto em relação à cor como quanto ao seu odor. De notar que os resultados obtidos para a amostra M6 são apenas referentes a dois meses de ensaio e até esse ponto não foram detetadas variações acentuadas nas suas características organoléticas.

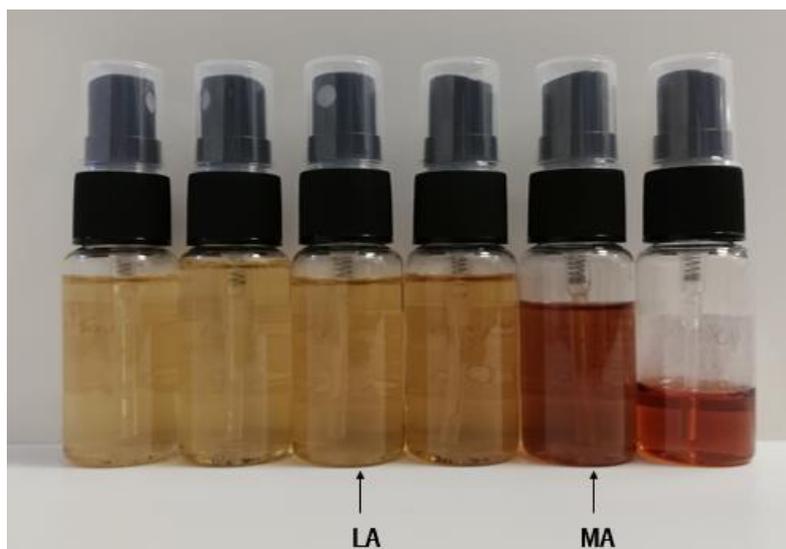
**Tabela 12:** Avaliação das características organoléticas das amostras ao longo do período de estabilidade acelerada.

	Alteração cor		Alteração odor	
	LA	MA	LA	MA
<b>E1</b>	Dia 15	Dia 60	Dia 30	Dia 60
<b>E2</b>	Dia 30	Dia 60	Dia 30	Dia 60
<b>E3</b>	Dia 15	Dia 37	Dia 30	Dia 37
<b>E4</b>	Dia 37	Dia 60	Dia 37	Dia 60
<b>E5</b>	Dia 52	Dia 60	Dia 52	Dia 60
<b>E6</b>	Dia 22	-	Dia 22	-

Legenda: LA- ligeiramente alterado; MA- muito alterado

A avaliação sensorial das características organoléticas foi efetuada fazendo a comparação com um controlo mantido em refrigeração de modo a preservar as suas propriedades. De um modo geral, uma ligeira alteração do produto significa que se observou uma ténue intensificação da sua coloração e do seu odor, sendo que estas alterações seriam impercetíveis ao consumidor final. Quando um perfume foi avaliado como muito alterado, significa que o produto se encontrava notavelmente mais escuro e com um odor tipicamente referido como oxidado. De notar que em perfumaria, uma fragrância tornar-se oxidada não se refere especificamente à ocorrência de reações de oxidação, mas sim a um conjunto de reações que levam ao escurecimento do produto, assim como à formação de um odor rânido.

A Figura 21 exemplifica os critérios aplicados na avaliação da cor da amostra E1.



**Figura 21:** Alterações de cor na amostra E1 com indicação da avaliação correspondente, sendo que o primeiro frasco corresponde ao controlo.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11 podemos concluir que, em relação ao pH, todas as amostras se encontram dentro do limite estabelecido após o período de ensaio (< 25 %), sendo a variação máxima de pH observada na amostra E3, com um aumento de 21,5 %. Por norma a oxidação de um perfume traduz-se numa redução do pH, aliado a um aumento da condutividade<sup>61</sup>. Contrariamente ao esperado, tal foi apenas verificado nas amostra E1 e E6, sendo que nas restantes amostras se observou um aumento no valor do pH.

Apesar de não existirem limites estabelecidos para os valores de condutividade, os resultados obtidos vão de encontro aos valores normalmente verificados em fragrâncias. A maior variação deu-se na amostra E1, cuja condutividade intrínseca era superior às restantes. O parâmetro da densidade foi o que sofreu um aumento mais drástico, sendo a variação máxima, de 0,054 g/mL, verificada novamente na amostra E1.

Apesar dos parâmetros físico-químicos, à exceção da densidade, se apresentarem relativamente estáveis ao longo do ensaio, o mesmo não se verificou com as características organoléticas. Assim, os valores de variação observados para cada parâmetro entre os pontos de LA e MA, referentes a alterações de odor, foram compilados na Tabela 13. Desta forma é possível verificar em que intervalos ocorreram as alterações que resultaram na oxidação do perfume.

**Tabela 13:** Intervalo da variação de pH, condutividade e densidade observados entre os pontos de LA e de MA, em relação ao odor.

	$\Delta$ pH (%)	$\Delta$ condutividade ( $\mu$ S)	$\Delta$ densidade (g/mL)
E1	- 4,9 → - 10,0	4,0 → 9,2	0,010 → 0,054
E2	9,8 → 10,1	3,8 → 5,7	0,013 → 0,036
E3	6,2 → 11,1	3,6 → 4,0	0,014 → 0,017
E4	4,0 → 6,3	3,2 → 5,4	0,005 → 0,007
E5	6,8 → 10,2	4,4 → 4,7	0,001 → 0,008
E6	-	-	-

É possível verificar que entre as diferentes amostras há uma sobreposição dos valores obtidos para LA e MA, ou seja, um determinado valor pode significar ligeiras alterações num perfume e alterações severas noutra. Por exemplo em relação ao pH, uma variação de 9,78 % na amostra E2 revela alterações leves, enquanto que na amostra E4 uma variação menor, de 6,25 %, já reflete alterações consideráveis no produto. O mesmo pode ser verificado no parâmetro da condutividade, sendo que uma variação de 4,0  $\mu$ S indica alterações ligeiras na amostra E1 e variações severas na amostra E3. Em termos de densidade, um aumento de 0,007 g/mL foi suficiente para se verificarem alterações significativas na amostra E4, no entanto a amostra E3 permaneceu estável até se verificar um aumento de 0,014 g/mL.

Uma vez que os resultados obtidos para a amostra E6 são apenas referentes a 2 meses de ensaio e até esse ponto não foram observadas variações acentuadas ao nível das características organoléticas, tornou-se impossível a avaliação das variações entre LA e MA.

Devido às discrepâncias verificadas entre amostras, foi impossível estabelecer intervalos médios de variação no qual se verificam as alterações ligeiras e alterações acentuadas. Tal pode ser explicado pelo facto de as amostras em estudo apresentarem rotas olfativas distintas, refletindo diferenças ao nível das características intrínsecas à própria formulação. Assim, seria relevante fazer a avaliação de diversos perfumes com o mesmo perfil olfativo de modo a possivelmente obter um padrão e estabelecer limites de aceitação para cada parâmetro.

Uma metodologia alternativa, e possivelmente mais apropriada, seria uma abordagem “caso a caso”. Dado que os perfumes são soluções muito complexas e diferentes entre si, era importante realizar um

número superior de réplicas para cada perfume de modo a que fosse possível estabelecer limites de aceitação individualizados, correspondendo a valores mais representativos do perfume em questão.

Ao longo dos ensaios de estabilidade acelerada tornaram-se evidentes incompatibilidades com o material de acondicionamento, sendo que os pulverizadores utilizados para as amostras E1 – E5 não eram os mais indicados para os frascos em uso. Assim, não foi possível uma avaliação representativa da estabilidade dos perfumes em estudo. Posto isto tornou-se impossível fazer a estimativa dos prazos de validade dos produtos, sendo necessária a reavaliação dos mesmos empregando os pulverizadores adequados.

Para a amostra E6, dado que os frascos onde o perfume é comercializado são transparentes, foi necessária a sua avaliação quando expostos à luz solar. Os resultados referentes a esse ensaio são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14:** Intervalos de valores obtidos para pH, condutividade e densidade, e variações máximas para cada parâmetro nos ensaios de exposição à radiação solar para a amostra E6.

	pH	$\Delta$ pH máx. (%)	Condutividade ( $\mu$ S)	$\Delta$ condutividade máx. ( $\mu$ S)	Densidade (g/mL)	$\Delta$ densidade máx. (g/mL)
E6	5,73 – 6,26	-8,55	4,6 – 6,1	0,4	0,858 – 0,860	0,001

Os resultados obtidos para o parâmetro de pH encontram-se dentro do esperado, sendo verificada uma diminuição do valor do pH ao longo do ensaio. Esta redução do pH é acompanhada por um ligeiro aumento ao nível da condutividade, comportamento típico no processo de oxidação de perfumes. O produto, no entanto, não sofreu variações significativas, considerando-se apto.

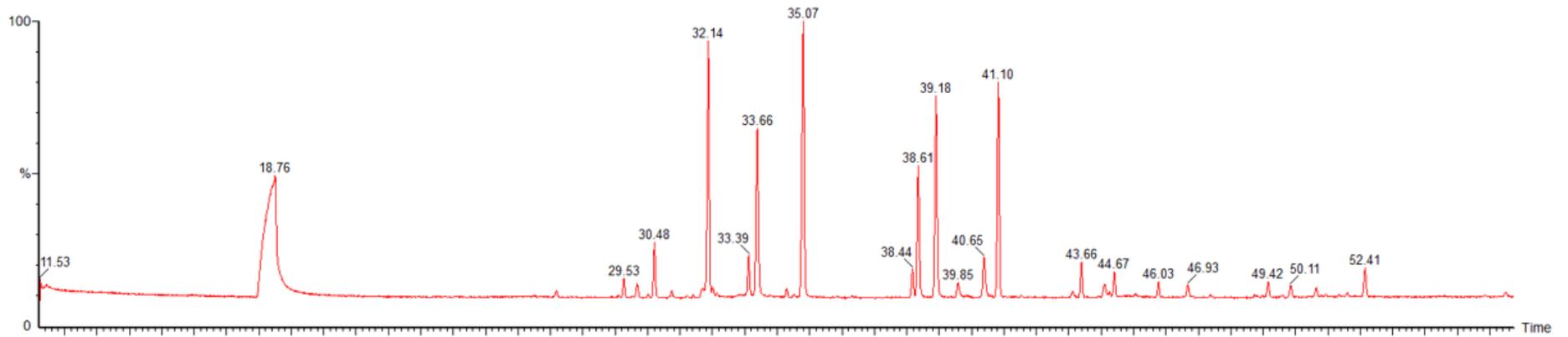
A avaliação das características organolépticas evidenciou alterações ao nível do cheiro na quarta semana de estudo, no entanto essa variação não foi significativa.

Os dados obtidos nos ensaios de estabilidade acelerada até ao momento, relativamente à amostra E6, evidenciam que este se mantém estável pelo menos durante 2 meses de estudo. Estes resultados traduzem-se numa estimativa do prazo de validade de 2 anos.

### 4.1.3. Análises por GC-MS

Uma vez que os resultados obtidos pelas análises físico-químicas, nomeadamente o pH, não foram de encontro com o esperado, e os restantes parâmetros não permitiram tirar conclusões objetivas, sentiu-se a necessidade de averiguar se existiam diferenças entre os compostos presentes na fragrância oxidada e na não oxidada. Para tal foram analisados, por GC-MS, dois perfumes oxidados e os respetivos perfumes não oxidados (E7 e E8) (Figura 22 e Figura 23).

### E6 Não oxidado



### E6 Oxidado

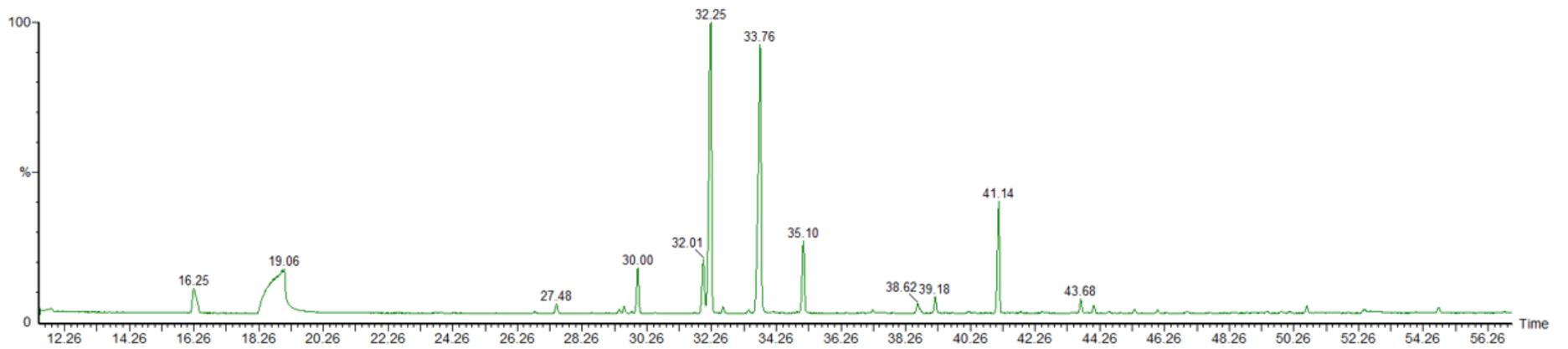
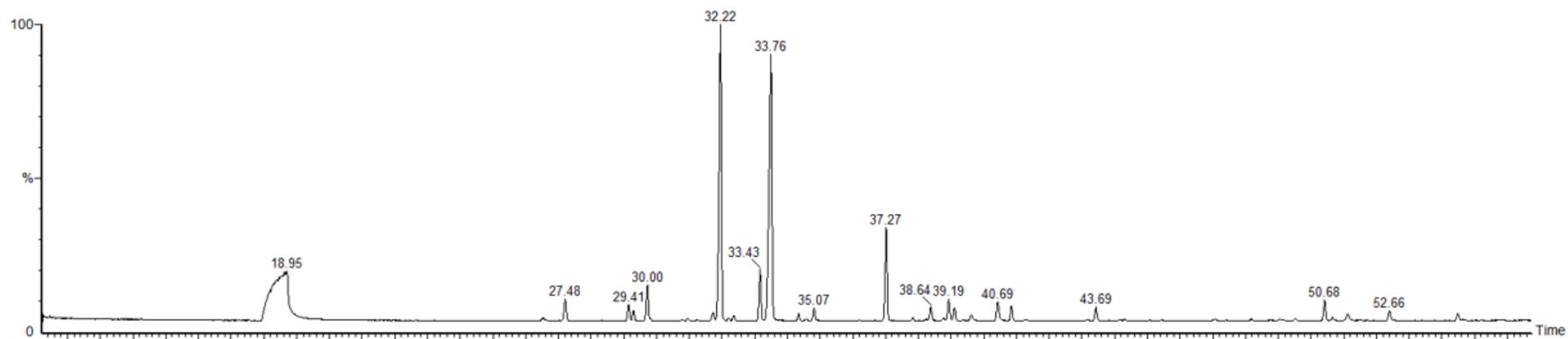


Figura 22: Cromatogramas obtidos para a análise da amostra E7 nos estados oxidado e não oxidado (condições de análise indicadas na Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6).

### E7 Não oxidado



### E7 Oxidado

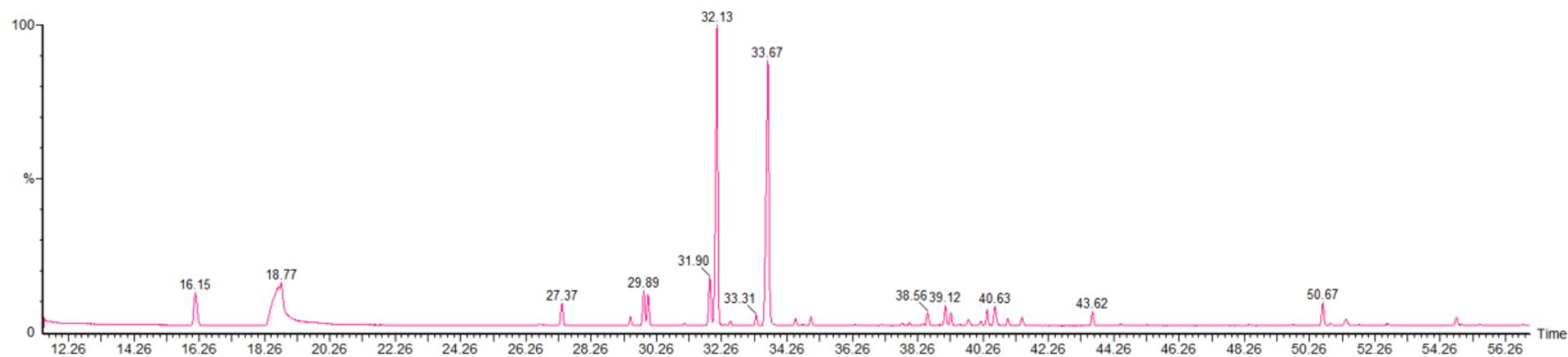


Figura 23: Cromatogramas obtidos para a análise da amostra E8 nos estados oxidado e não oxidado (condições de análise indicadas na Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6).

A comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra E7 evidencia algumas diferenças entre as amostras oxidada e não oxidada. Primeiramente, no cromatograma da amostra oxidada, é possível observar um pico a um tempo de retenção de 16,25 minutos, inexistente no cromatograma da amostra não oxidada. Recorrendo à biblioteca de espectros do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) foi possível identificar o composto acetaldeído dietil acetal. Este composto é comumente detetado em amostras envelhecidas, sendo produto de reações de acetilação e, devido ao seu aroma subtil, leva a uma perda de intensidade da fragrância<sup>23</sup>.

É ainda possível verificar, no cromatograma da amostra oxidada, a ausência de diversos picos presentes no cromatograma da amostra original, correspondendo estes a notas relevantes ao perfil olfativo da fragrância. Dos quais destaca-se o  $\beta$ -mirceno com tempo de retenção de 46,03 min., o piperonal com tempo de retenção de 46,93 min., o  $\alpha$ -cedreno com saída aos 49,42 min. e o *cashmeran* aos 52,41 min.

No cromatograma da amostra E8 oxidada, tal como observado na amostra E7, é possível verificar a presença do composto acetaldeído dietil acetal, inexistente no cromatograma da amostra não oxidada, validando novamente o descrito na literatura<sup>23</sup>. No cromatograma da amostra oxidada observou-se igualmente a perda de diversos picos relevantes, correspondendo estes aos compostos o *methy/ pamplemousse*, com tempo de retenção de 37,27 min. e o lilial, com tempo de retenção de 52,66 min.

Apesar dos resultados obtidos pelas análises de GC-MS evidenciarem visíveis discrepâncias entre a composição das amostras oxidadas e não oxidadas, é importante ressaltar que alguns dos produtos das reações que provocaram a oxidação do perfume poderão não ser voláteis ou detetáveis nas condições de análise aplicadas. Os hidroperóxidos, típicos produtos de oxidação, são um exemplo disso, não sendo geralmente detetados em análises por cromatografia gasosa devido à sua instabilidade térmica<sup>62</sup>. De modo a obter uma melhor compreensão das reações químicas que ocorrem num perfume para que este se torne oxidado, seria de interesse complementar o estudo recorrendo a outras técnicas analíticas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para além das amostras E7 e E8, foram analisadas outras amostras oxidadas, no entanto a interpretação dos seus cromatogramas foi impossibilitada pela falta de resolução dos mesmos. O facto de se observarem picos sobrepostos não permitiu a identificação dos compostos presentes na formulação. A análise de uma vasta gama de produtos oxidados iria permitir confirmar se a presença do composto acetaldeído dietil acetal é comum a todos os perfumes oxidados.

## 4.2. Maceração

O processo de maceração de uma fragrância, apesar de fundamentalmente empregue pelos fabricantes de perfumes, é ainda um passo enigmático, existindo uma notória discrepância nos períodos adotados por cada fabricante.

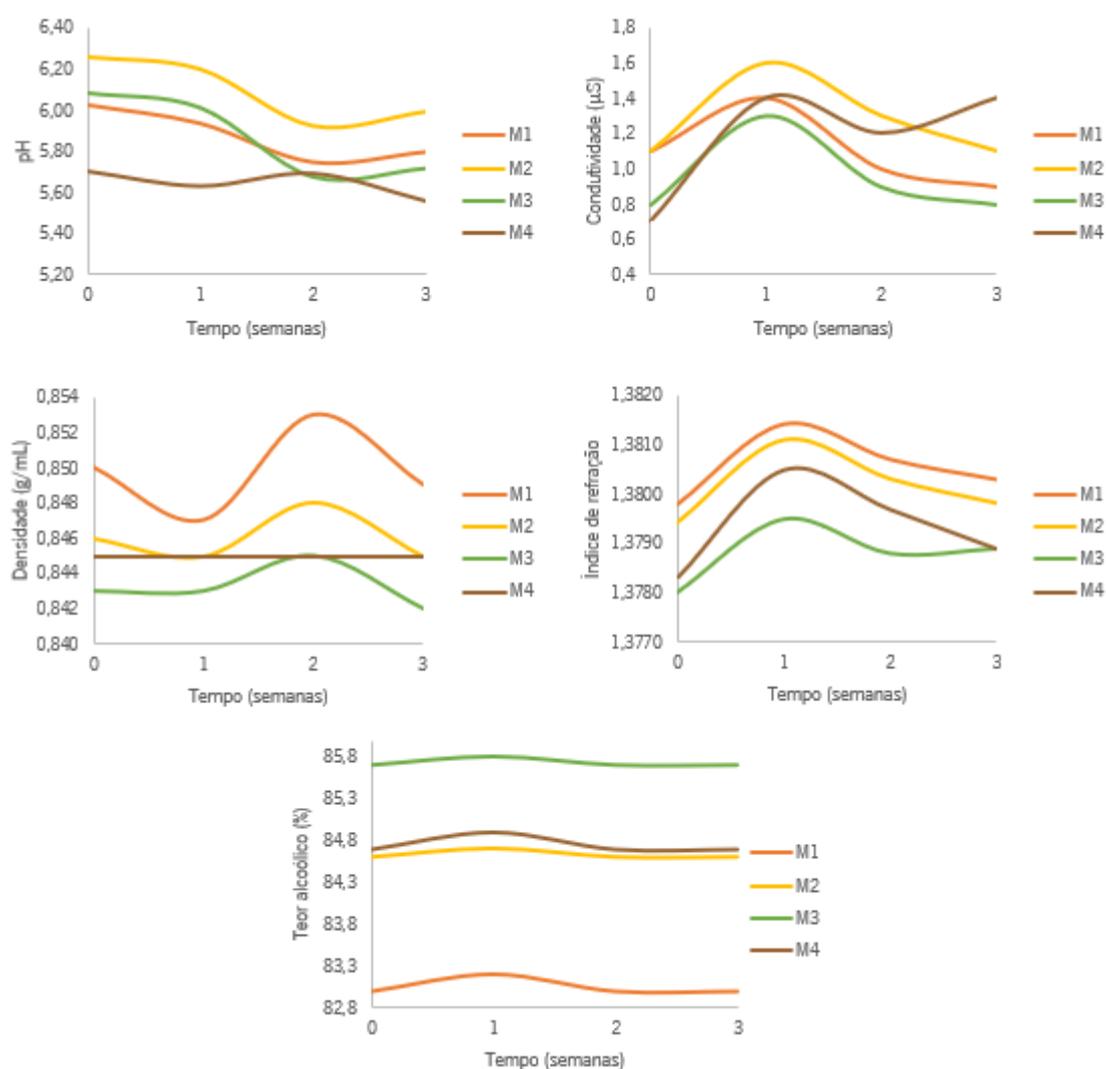
Durante este processo ocorre uma considerável diminuição do odor a etanol do perfume, resultando numa melhor percepção das notas olfativas presentes na essência. A apreciação da maceração de um perfume baseia-se na avaliação das suas características organoléticas, nomeadamente do seu odor. Apesar das alterações serem evidentes a um indivíduo com experiência, as avaliações são subjetivas, pelo que surge uma necessidade de implementar uma abordagem analítica para complementar a avaliação sensorial. No entanto, em termos físico-químicos não existem atualmente normas ou guias a pôr em prática para assegurar a total maceração de um produto perfumado.

Dado que cada perfume possui a sua própria formulação, o tempo necessário para que se complete a sua maceração será também característico. Assim, foi feita uma avaliação individual a cada perfume. Após a obtenção dos resultados referentes aos ensaios de maceração da totalidade das amostras, estas foram divididas com base em semelhanças nas variações observadas dos parâmetros avaliados.

## 4.2.1. Amostras M1, M2, M3 e M4

A

Figura 24 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros de pH, condutividade, densidade, índice de refração e teor alcoólico para as amostras M1, M2, M3 e M4 ao longo do período de maceração.



**Figura 24:** Resultados obtidos para os parâmetros do pH, condutividade, densidade, índice de refração e teor alcoólico para as amostras M1, M2, M3 e M4 ao longo do ensaio de maceração.

A comparação dos valores obtidos nos diferentes parâmetros para as amostras M1 - M4, mostra comportamentos relativamente semelhantes ao longo do período de maceração. Ao nível do pH observou-se um decréscimo na primeira semana de estudo, verificado em todas as amostras. Entre a primeira e segunda semana observou-se um decréscimo acentuado no valor de pH das amostras M1, M2 e M3, sendo que na amostra M4 foi verificado o contrário. Após a segunda semana de maceração ocorreu um ligeiro aumento no valor do pH de M1, M2 e M3, contrariamente ao observado para M4, no entanto estas variações foram pouco significativas.

A avaliação da condutividade das amostras evidenciou um incremento destes valores na primeira semana de maceração. Para as amostras M1, M2 e M3, o valor máximo de condutividade foi verificado após a primeira semana de maceração, sendo que a partir da segunda, e até ao final do estudo, os valores de condutividade permaneceram relativamente estáveis. Os valores de condutividade da amostra M4, contrariamente ao verificado nas restantes, não estabilizaram no decorrer do estudo, observando-se um novo aumento após a segunda semana de maceração.

As amostras M1, M2 e M3, exibiram comportamento similar ao nível das variações de densidade, no entanto este parâmetro não estabilizou ao longo das quatro semanas, contrariamente ao esperado e ao verificado na amostra M4. O impacto mais perceptível que o processo de maceração tem no produto é a diminuição do odor a etanol, pelo que a dissipação do etanol e consequente aumento de densidade seria expectável, no entanto a amostra M4 mantém-se estável ao longo dos quatro pontos de maceração. Nas restantes amostras, após a primeira semana de ensaio foi notória uma diminuição da densidade, mais evidente na amostra M1. A diminuição do valor da densidade é acompanhada por um ligeiro aumento no teor alcoólico, sendo este aumento de 0,1 % nas amostras M2 e M3 e de 0,2 % na amostra M1. A aplicação de um tempo de maceração de duas semanas traduziu-se num aumento considerável da densidade nas amostras M1, M2 e M3, que deveria corresponder à dissipação de parte do etanol presente na mistura. O confronto dos valores de densidade com os obtidos para o teor alcoólico na segunda semana de estudo, no entanto, negam essa hipótese, dado que não se verificou uma diminuição do teor alcoólico nas amostras.

Como abordado no enquadramento teórico (ponto 2.1.9), uma das principais reações passíveis de ocorrer ao longo do processo de maceração é a formação de bases de Schiff, com libertação de moléculas de água. Dado que a água tem uma densidade superior à de um perfume, o aumento de

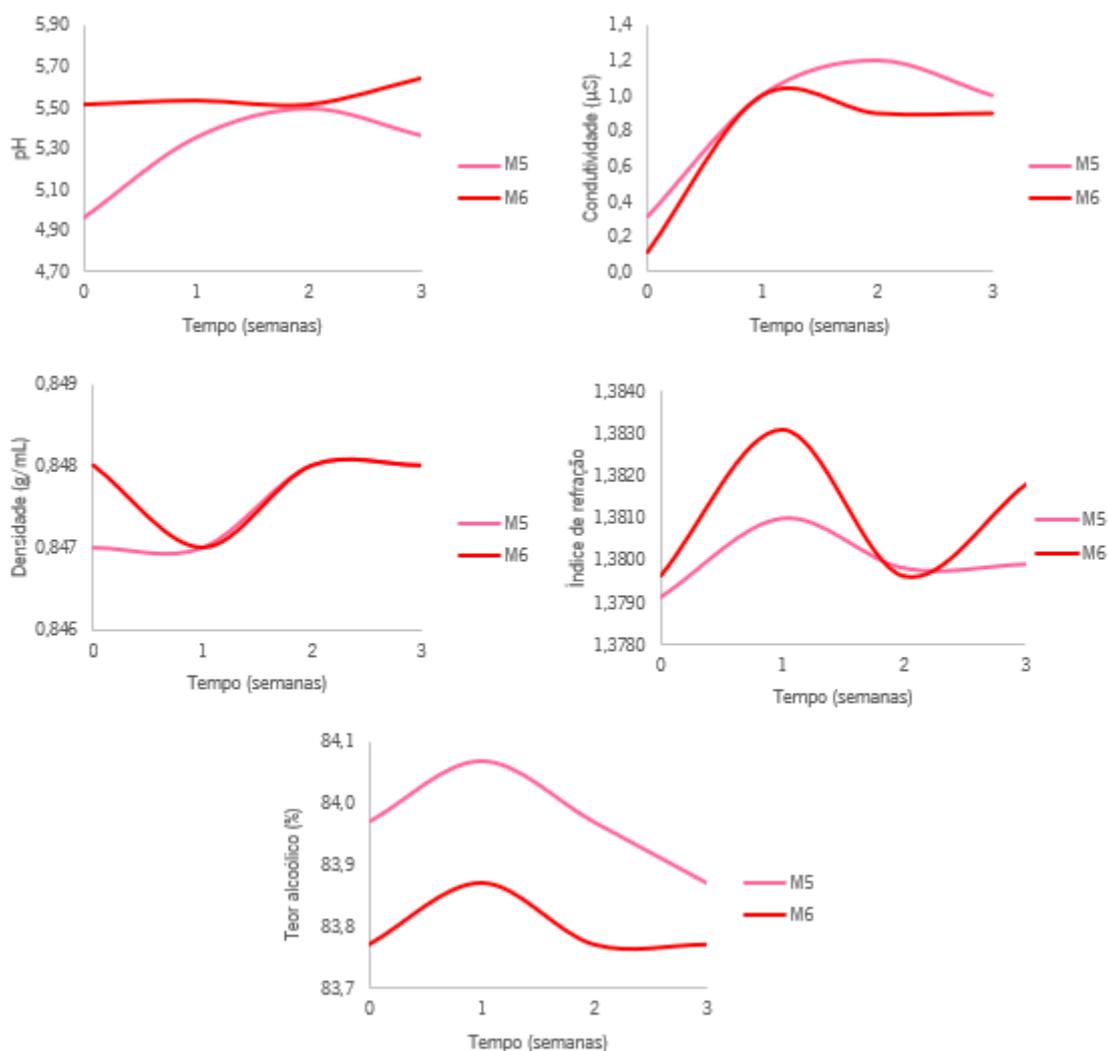
densidade verificado poderá dever-se a este fenómeno, no entanto os dados adquiridos não permitem inferir tal conclusão. A realização de uma análise por GC-MS poderia elucidar acerca deste fenómeno<sup>63</sup>.

A avaliação do índice de refração é comumente aplicada na indústria da perfumaria, permitindo análises rápidas, fáceis e acessíveis. Este parâmetro permite avaliar a complexidade de uma fragrância, pelo que a sua aplicação no estudo da maceração pode mostrar-se útil. Semelhantemente ao verificado nas análises de condutividade, observou-se um aumento nos valores do índice de refração na primeira semana de maceração, sendo que após a segunda semana os valores se mantiveram constantes até findar o estudo. Por norma um aumento no índice de refração de um perfume indica uma maior concentração ou massa molecular dos componentes da fragrância. Isto deve-se ao facto de que o percurso ótico será mais desviado com a presença de um maior número de moléculas ou de moléculas de grandes dimensões<sup>64</sup>. Os resultados obtidos para este parâmetro são promissores, uma vez que indicam que durante a primeira semana se dá a grande maioria das reações, atingindo-se um equilíbrio após duas semanas de maceração.

Fazendo a correlação dos diferentes parâmetros avaliados, é possível obter uma visão geral das alterações que ocorrem numa fragrância ao longo do período de maceração. Os resultados obtidos sugerem que, para as amostras M1, M2 e M3 o equilíbrio químico é atingido após duas semanas de maceração, o que se traduz numa redução de uma semana no período de maceração habitual. A amostra M4, por outro lado, levanta algumas dúvidas, pelo que seria mais seguro optar pelo tempo de maceração atualmente empregue pela Nortempresa.

#### 4.2.2. Amostras M5 e M6

Os resultados obtidos para os diversos parâmetros físico-químicos medidos nas amostras M5 e M6 ao longo do ensaio de maceração são apresentados na Figura 25.



**Figura 25.** Resultados obtidos para os parâmetros do pH, condutividade, densidade, índice de refração e teor alcoólico para as amostras M5 e M6 ao longo do ensaio de maceração.

Relativamente aos valores de pH, as amostras M5 e M6 apresentam comportamentos distintos, sendo que a amostra M5 sofre um aumento significativo de pH nas primeiras duas semanas de maceração. Este valor decresce a partir da segunda semana, no entanto este decréscimo não é significativo. Por outro lado, o pH da amostra M6 permanece relativamente estável ao longo das primeiras duas semanas de estudo, sofrendo um aumento após a segunda semana de estudo. Este comportamento foi apenas observado nesta amostra, o que não permitiu tirar conclusões relevantes.

Tal como observado nas amostras anteriores (M1 - M4), foi visível um aumento gradual do valor da condutividade, para ambas as amostras (M5 e M6). Este parâmetro atinge o valor máximo ao fim da primeira semana de maceração para a amostra M6, e na segunda semana para a amostra M5. Após a

segunda semana de maceração verifica-se a estabilização dos valores da condutividade da amostra M6, no entanto para a amostra M5 não se chega a observar tal fenómeno.

Apesar da densidade ter sofrido oscilações ao longo do período de maceração, estas são na ordem dos 0,01 g/mL, pelo que não se revelam significativas. Todavia, para ambas as amostras, foi clara a estabilização do valor da densidade após duas semanas de maceração.

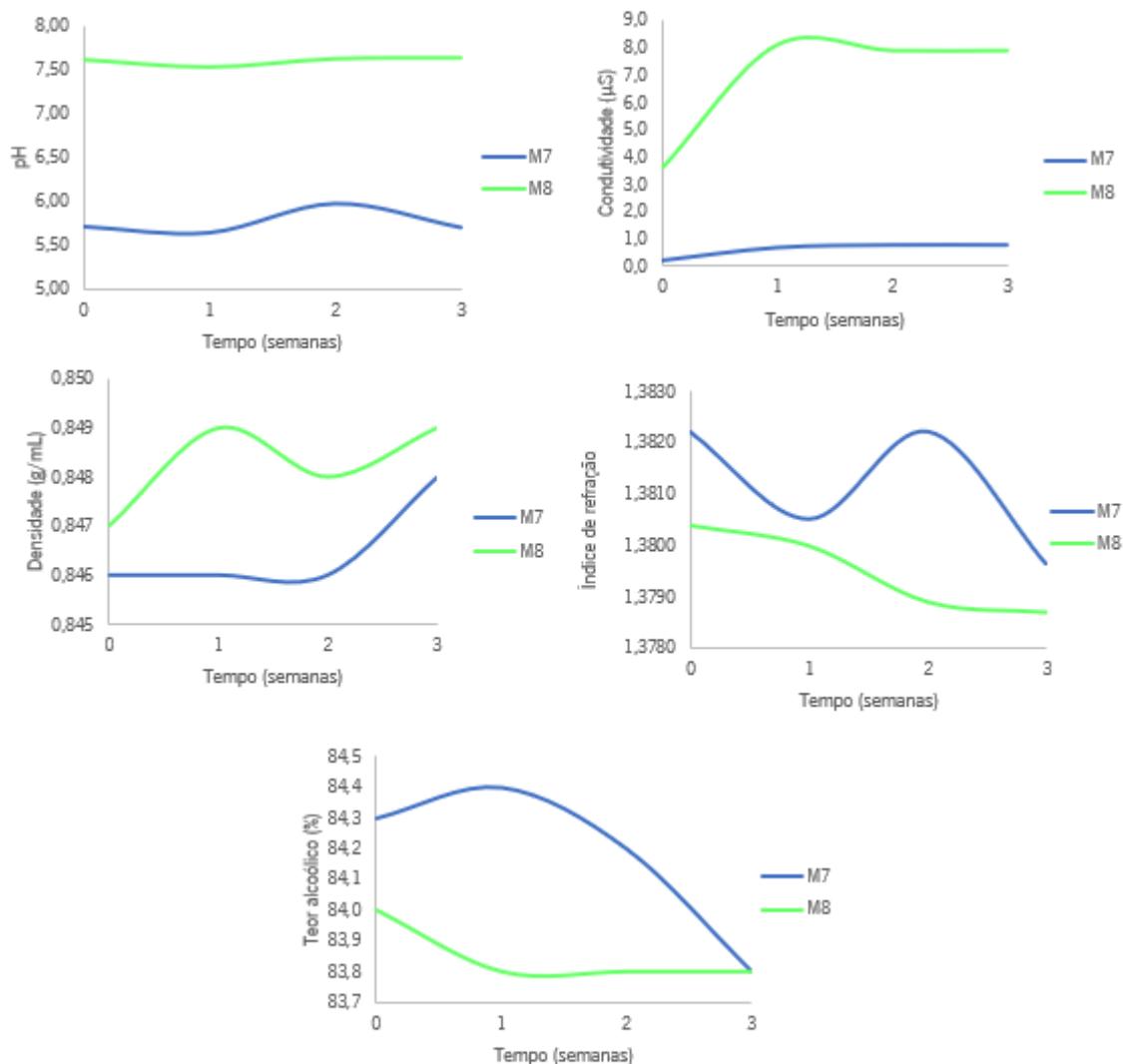
Similarmente ao verificado para as amostras M1 - M4, verificou-se para as amostras M5 e M6 um aumento nos valores do índice de refração imediatamente após a produção dos perfumes. Na amostra M5 este valor estabilizou na segunda semana de maceração, no entanto a amostra M6 sofreu um novo aumento durante a terceira semana de maceração. Assim, podemos concluir que a amostra M5 atingiu o equilíbrio químico na segunda semana de maceração, porém o mesmo não se constatou para a M6.

Os valores referentes ao teor alcoólico sofreram um aumento na primeira semana de maceração, voltando ao valor inicial após duas semanas de maceração. Este valor manteve-se estável para a amostra M6, no entanto o mesmo não foi verificado para a amostra M5, em que o teor alcoólico continuou a diminuir.

Os resultados obtidos sugerem que, para a amostra M5, o equilíbrio químico é atingido após duas semanas de maceração, o que se traduz numa redução de uma semana no período de maceração habitual. A amostra M6, por outro lado, não se apresenta estável após as primeiras duas semanas, pelo que o protocolo de maceração adotado deverá manter-se.

### 4.2.3. Amostras M7 e M8

Os resultados obtidos para os diversos parâmetros físico-químicos medidos nas amostras M7 e M8 ao longo do ensaio de maceração são apresentados na Figura 26.



**Figura 26:** Resultados obtidos para os parâmetros do pH, condutividade, densidade, índice de refração e teor alcoólico para as amostras M5 e M6 ao longo do ensaio de maceração.

A representação gráfica dos resultados obtidos para o pH permitiu verificar um ligeiro aumento destes valores para a amostra M7, sendo atingido o valor máximo de pH após duas semanas de maceração. Por outro lado, o pH da amostra M8 manteve-se estável ao longo de todo o período de maceração.

O parâmetro da condutividade, tal como esperado, sofreu um aumento na primeira semana de maceração em ambas as amostras, sendo que os valores permaneceram estáveis durante o período remanescente.

Quanto à densidade, no caso da amostra M7, o valor manteve-se constante durante as duas primeiras semanas de maceração, observando-se um aumento após este ponto. Já a amostra M8 sofreu variações contínuas, não se tendo verificado a estabilização dos valores deste parâmetro.

Os valores do índice de refração da amostra M8 sofreram uma diminuição nas duas primeiras semanas de maceração, atingindo o valor mínimo, e estabilizando no restante período de estudo. Na amostra M7, por sua vez, não se verificou a estabilização dos valores deste parâmetro. Este parâmetro, como supramencionado, revela a complexidade de uma fragrância, pelo que a diminuição do índice de refração observada na amostra M8 vai contra o esperado.

O teor alcoólico das amostras, tal como previsto, sofreu uma diminuição ao longo do tempo de maceração. Esta diminuição deu-se, para a amostra M8, durante a primeira semana, estabilizando a partir deste ponto. Já o teor alcoólico da amostra M7 sofreu um ligeiro aumento na primeira semana, sendo que a partir da primeira semana os valores deste parâmetro desceram drasticamente até ao final do estudo, não se observando uma estabilização dos mesmos.

Os resultados obtidos sugerem que, para a amostra M8, o equilíbrio químico é atingido após duas semanas de maceração, o que se traduz numa redução de uma semana no período de maceração. A amostra M7, por outro lado, não se apresenta estável após as primeiras duas semanas de maceração, pelo que o protocolo de maceração adotado deverá manter-se.

#### 4.2.4. Aspectos globais da maceração

Para além da avaliação dos parâmetros físico-químicos, foi feita a monitorização das propriedades organoléticas para todas as amostras em estudo, sendo o principal foco o odor. Imediatamente após a produção das fragrâncias em estudo era bastante perceptível o odor a etanol, o qual desvaneceu ao longo do período de estudo, sendo mais notório após as duas primeiras semanas de maceração.

De notar que os perfumes avaliados, apesar de apresentarem formulações semelhantes, foram produzidos em diferentes volumes, para além de possuírem perfis olfativos distintos, sendo avaliadas fragrâncias tanto masculinas como femininas. Dado que a presença de oxigénio catalisa reações de oxidação nos perfumes, seria de esperar que fatores como o volume de perfume produzido, e conseqüente volume de ar dentro da cuba, assim como a própria geometria da cuba pudessem afetar o processo de maceração. A obtenção de uma total maceração do produto poderia ainda ser variável consoante as características intrínsecas das formulações em estudo, sendo que, em teoria, fragrâncias mais leves atingiriam o equilíbrio químico mais rápido. Esta teoria tem por base o facto de fragrâncias

mais fortes, como é o exemplo de perfumes amadeirados, apresentarem uma maior proporção de notas de fundo que, pelas suas maiores dimensões, atrasariam a ocorrência de colisões intermoleculares.

Estes parâmetros não parecem impactar a velocidade do processo de maceração, no entanto este estudo tem apenas validade para as formulações avaliadas, sendo impossível tirar conclusões acerca de perfumes preparados com diferentes formulações. Assim, seria relevante a avaliação de diferentes formulações e volumes de produção, de modo a garantir a total maceração de todos os produtos. Torna-se ainda necessária a validação dos resultados obtidos, sendo imperativa uma nova avaliação aquando de uma próxima produção de cada perfume estudado.

A avaliação global dos resultados obtidos nos ensaios de maceração permitiu ainda avaliar quais os parâmetros físico-químicos que mais informações fornecem acerca do estado de maceração de um perfume, levando a crer que a condutividade e o índice de refração são os que mais elucidam acerca das reações que ocorrem ao longo do período de maceração. Estes parâmetros evidenciaram padrões constantes nas diferentes amostras e o facto de estabilizarem no decorrer do estudo pode indicar que se atingiu o equilíbrio químico.

## Capítulo 5 – Considerações finais

A realização do projeto de estágio conducente à elaboração da presente dissertação resultou em conclusões relevantes acerca dos processos aos quais os perfumes são submetidos. Os estudos realizados ao longo deste trabalho são representativos dos procedimentos adotados pela Nortempresa, tanto nas etapas de desenvolvimento do produto como na sua produção.

Os ensaios de estabilidade são um passo fundamental no desenvolvimento de uma nova formulação, no entanto é um processo que requer otimização. Os resultados obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada não permitiram tirar conclusões pertinentes relativamente às amostras E1 – E5, dado que não foi possível estabelecer uma estimativa do prazo de validade dos produtos. Posto isto, seria de interesse reavaliar os perfumes em questão utilizando material de acondicionamento mais representativo do utilizado para comércio das fragrâncias. Por outro lado, os ensaios realizados em frascos de laboratório (E6) mostraram-se positivos, sendo possível a estimação do prazo de validade para 2 anos.

Os dados obtidos nos ensaios de estabilidade não permitiram, contudo, reconhecer um padrão de oxidação dos perfumes em estudo, impossibilitando o estabelecimento de limites máximos de aceitação dos parâmetros físico-químicos avaliados. Assim, seria útil a aplicação de diferentes métodos de análise, nomeadamente a determinação do índice de peróxidos, de modo a complementar os resultados obtidos para o pH e condutividade<sup>65,66</sup>.

Relativamente à avaliação da cor do produto, o método utilizado não é o mais apropriado, estando sujeito a subjetividade por parte de operador. O facto de as avaliações serem realizadas pelo mesmo operador minimizou possíveis discrepâncias entre resultados, no entanto a implementação de técnicas analíticas como espectroscopia UV/Visível seria a opção mais confiável. Em relação à avaliação do odor ao longo dos testes de estabilidade, a análise sensorial demonstra ser adequada, sendo essencial a formação do operador nesse âmbito.

Em termos da avaliação do estado de oxidação dos perfumes, o resultado mais relevante foi obtido pelas análises por GC-MS, revelando a presença do composto acetaldeído dietil acetal em amostras oxidadas. O reduzido número de cromatogramas analisados, no entanto, não permite afirmar com segurança a presença desse composto em todos os perfumes oxidados, sendo necessária a recolha de um volume mais significativo de dados. Certamente a oxidação de um perfume leva à formação de inúmeros outros

compostos, indetetáveis pela técnica de GC-MS, pelo que análises por HPLC poderiam proporcionar uma melhor compreensão dos produtos de oxidação formados.

Relativamente aos estudos de maceração, os resultados obtidos foram bastante promissores, sugerindo a possibilidade de reduzir o tempo de maceração, de 5 dos 8 perfumes em estudo, em uma semana relativamente ao protocolo utilizado atualmente pela Nortempresa. Estes resultados, no entanto, necessitam de ser validados para os perfumes estudados e, dado que os resultados obtidos não podem ser generalizados, será necessária a avaliação individual de todas as fragrâncias produzidas.

De modo a avaliar o impacto de fatores como o volume de produção, o volume disponível nas cubas de armazenamento, e a formulação dos perfumes, seria relevante a implementação destes fatores em estudos subsequentes.

Apesar de o processo de maceração ser dispendioso, dado que o produto se encontra indisponível por um período alargado, a refrigeração ao qual os perfumes são submetidos após a maceração é igualmente cara. Futuramente seria ainda útil a avaliação do período de refrigeração de modo a averiguar a potencial redução deste passo.

## Referências bibliográficas

1. Wyatt, T. D. Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *J. Comp. Physiol. A* **196**, 685–700 (2010).
2. Varendi, H., Porter, R. H. & Winberg, J. Does the newborn baby find the nipple by smell? *Lancet* **344**, 989–990 (1994).
3. Buck, L. & Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175–187 (1991).
4. Buck, L. B. Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr. Rev.* **62**, 184–188 (2004).
5. Gomes, P. Engineering Perfumes - Tese de Douturamento em Engenharia Química. (Universidade do Porto, 2005).
6. Buck, L. B. *Information coding in the vertebrate olfactory system. Annu Reviews Neumscience* **19**, (1951).
7. Pybus, D. H. & Sell, C. S. *The Chemistry of Fragrances*. (The Royal Society of Chemistry, 1999).
8. História do perfume | Perfume Perfeito. Available at: <https://perfumeperfeito.com/artigos/historia-perfume>. (Accessed: 8th January 2019)
9. Müller, J. *The H & R book of perfume*. (Glöss, 1984).
10. Goodacre, T. & Perring, K. D. Patente- Perfume Compositions. (2002).
11. Frater, G., Kraft, P. & Muller, U. Patente- Odorant Compositions. (2000).
12. Kuhn, W., Walther, L. & Surburg, H. Patente- 2-Methyl-5-Phenylpentanal used as a rose odoriferous substance. (2007).
13. Narula, A. & Arruda, E. Patente- Polyalkylbicyclic derivatives. (2003).
14. Lemberg, S. Patente- Novel products and processes. (1974).
15. IFRA International Fragrance Association. Available at: <http://www.ifraorg.org/>. (Accessed: 21st January 2019)

16. Franks Bradford, F. & London, D. J. G. I. The structural properties of alcohol–water mixtures. *Q. Rev. Chem. Soc.* **20**, (1966).
17. Fabricacion de Perfumes y los alcoholes. Available at: [http://www.michellecharlin.com/A\\_Alcohol para Perfume.html](http://www.michellecharlin.com/A_Alcohol para Perfume.html). (Accessed: 17th January 2019)
18. Silva, J. N. C., Targino, O. A., Lima, A. N., Nunes, E. R. & Di, L. *Produção de perfumes caseiros: obtenção de um bom perfume para regiões quentes - IV Congresso Norte-Nordente de Química*. (2011).
19. Rowe, R. C., Sheskey, P. J. & Quinn, M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. (RPS Publishing, 2009).
20. Yehye, W. A. *et al.* Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *Eur. J. Med. Chem.* **101**, 295–312 (2015).
21. Benzophenone-2. Available at: <https://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/benzophenone-2>. (Accessed: 17th January 2019)
22. Benson, H. A. E., Roberts, M. S., Silva, V. R. L. & Walters, K. W. *Cosmetic formulation : principles and practice*. (CRC Press, 2019).
23. Calkin, R. R. & Jellinek, J. S. *Perfumery : practice and principles*. (John Wiley & Sons, 1994).
24. Dias, S. M. & Silva, R. R. Perfumes: Uma química inesquecível. *Química Nov. na Esc.* **4**, 3–6 (1996).
25. Barros, A. L. N. *Análise de Perfumes*. (2007).
26. Anthony, P. & Bowles, C.-P. What Is The Perfume Pyramid? Fragrance Composition & Life-Cycle. Available at: <https://bespokeunit.com/fragrance/pyramid/>. (Accessed: 17th January 2019)
27. What Is The Difference Between Parfum, Cologne & Eau de Toilette? Available at: <https://bespokeunit.com/fragrance/strength/>. (Accessed: 18th January 2019)
28. Schueller, R. & Romanowski, P. Common Scents: Fragrance in personal care products. *Cosmet. Toilet.* **111**, (1996).
29. Morrison, R. & Boyd, R. *Química Orgânica*. (Prentice-Hall, 2011).

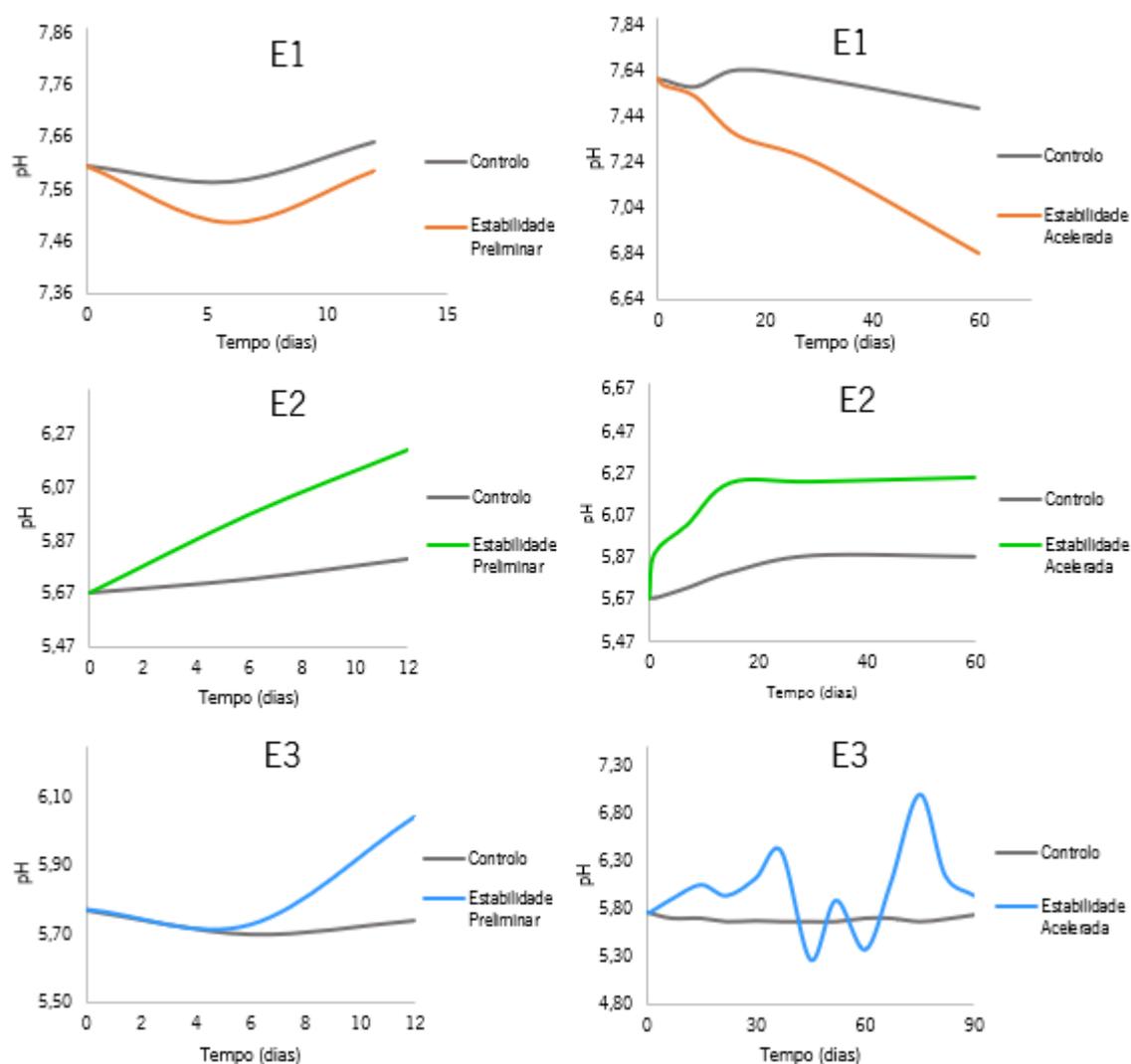
30. Bauer, K., Garbe, D. & Surburg, H. *Common fragrance and flavor materials : preparation, properties, and uses*. (Wiley-VCH, 1997).
31. Filippis, F. M. Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de óleos essenciais de Hon-sho e Ho-sho - Experimentos e Modelagem- Dissertação de Mestrado. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001).
32. Polak, E. H. Multiple profile-multiple receptor site model for vertebrate olfaction. *J. Theor. Biol.* **40**, 469–484 (1973).
33. BEETS, M. G. J. The Molecular Parameters of Olfactory Response. *Pharmacol. Rev.* **22**, 1–34 (1970).
34. Mainland, J. D. *et al.* The missense of smell: functional variability in the human odorant receptor repertoire. *Nat. Neurosci.* **17**, 114–120 (2014).
35. Chisvert, A. & Salvador, A. Perfumes in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods for Fragrance Ingredients and other Related Chemicals in Cosmetics. *Anal. Cosmet. Prod.* 243–256 (2007).
36. López-Nogueroles, M., Chisvert, A. & Salvador, A. A chromatometric approach for evaluating and selecting the perfume maceration time. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3150–3160 (2010).
37. Yudov, M. The Life Span of a Perfume: Mixing and Aging ~ Columns. (2016). Available at: <https://www.fragrantica.com/news/The-Life-Span-of-a-Perfume-Mixing-and-Aging-8125.html>. (Accessed: 23rd January 2019)
38. Herman, S. J. Applications II: Fragrance. in *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances* (ed. Rowe, D. J.) 305–329 ( Blackwell Publishing Ltd, 2005).
39. ISO 22716:2007- Good Manufacturing Practices (GMP).
40. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. (2004).
41. Choe, E. & Min, D. B. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **5**, 169–186 (2006).
42. Ribeiro, A. M. Desenvolvimento de produtos cosméticos: teste de estabilidade- Tese de Doutorado. (Universidade de São Paulo, 2001).

43. Pereira, C. Estudo da substantividade de uma composição aromática na pele em função do ciclo menstrual- Tese de Mestrado. (Universidade de São Paulo, 2009).
44. van Asten, A. The importance of GC and GC-MS in perfume analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **21**, 698–708 (2002).
45. Mondello, L., Casilli, A., Quinto Tranchida, P., Dugo, G. & Dugo, P. Comprehensive two-dimensional gas chromatography in combination with rapid scanning quadrupole mass spectrometry in perfume analysis. *J. Chromatogr. A* **1067**, 235–243 (2005).
46. Sironi, S., Capelli, L., Villatoro, C., Vera, L. & Gygax, H. Comparative Study of Odours Present in Twin Fragrances by GC-sniffing-ToFMS. in *Chemical Engineering Transactions* **54**, (2016).
47. Mowery, K. A., Blanchard, D. E., Smith, S. & Betts, T. A. Investigation of Imposter Perfumes Using GC–MS. *J. Chem. Educ.* **81**, 87 (2004).
48. Ahuja, S. & Jespersen, N. D. *Comprehensive Analytical Chemistry-Modern Instrumental Analysis*. (Elsevier, 2006).
49. McNair, H. M. & Miller, J. M. *Basic Gas Chromatography*. (John Wiley & Sons, 2009).
50. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. & Grassi, M. T. *Fundamentos de química analítica*. (Pioneira Thomson Learning, 2006).
51. Ullmann, F. *et al. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. (VCH, 1985).
52. Grob, K. *Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography : concepts, processes, practical guidelines, sources of error*. (Wiley-VCH, 2001).
53. Kolb, B. & Ettre, L. S. *Static headspace-gas chromatography : theory and practice*. (John Wiley & Sons, 2006).
54. Başer, K. H. C. & Buchbauer, G. *Handbook of essential oils : science, technology, and applications*. (CRC Press, 2009).
55. Gross, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. (Springer, 2004).
56. PerkinElmer. Clarus SQ8 GC/MS Manuals V6.1.1. (2017).
57. De Hoffmann, E. & Stroobant, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. (John Wiley & Sons, 2013).

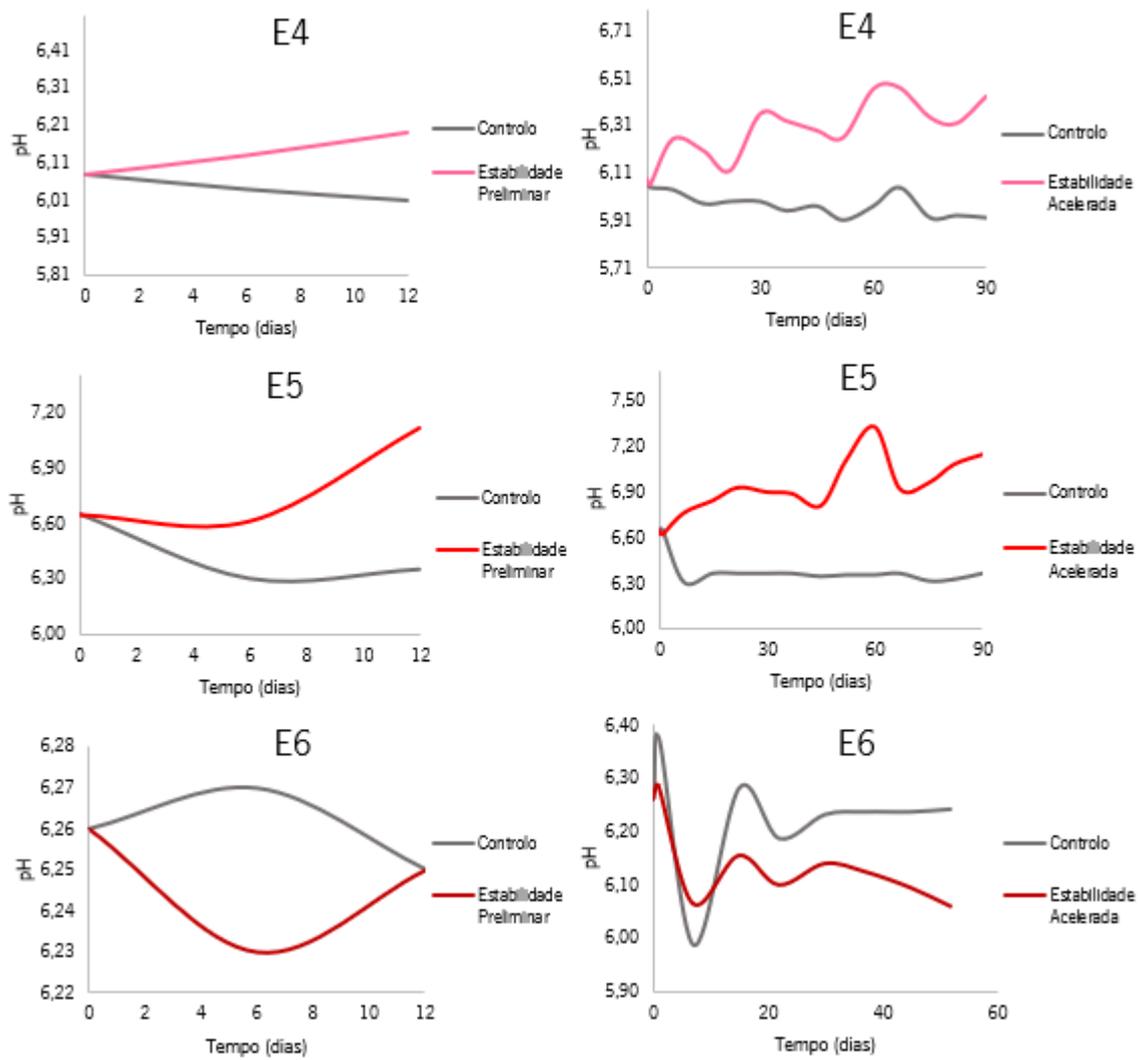
58. Mellon, F. A. Mass Spectrometry | Principles and Instrumentation. *Encycl. Food Sci. Nutr.* 3739–3749 (2003).
59. Iacona, P. *Procedimento para estudo de estabilidade de fragrâncias- Documento Interno.* (2000).
60. Fundamental Principles Governing Solvents Use. in *Handbook of Solvents* (eds. Silla, E., Arnau, A. & Tuñón, I.) 11–72 (ChemTec Publishing, 2014).
61. Turek, C. & Stintzing, F. C. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. *Food Res. Int.* **46**, 341–353 (2012).
62. Turnipseed, S. B., Allentoff, A. J. & Thompson, J. A. Analysis of Trimethylsilylperoxy Derivatives of Thermally Labile Hydroperoxides by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **213**, 218–225 (1993).
63. Irawan, C., Indryati, S., Sri Lestari, E., Hidaningrum, A. & Supriyono, S. Synthesis and Characterization of Aurantiol Schiff Base: Relationship Between Synthesis time and some Physical Properties. *Orient. J. Chem.* **34**, 394–400 (2018).
64. Sherlock, T. P. & Foy, A. *Analysis of brand name and imposter fragrance formulations. Journal of Undergraduate Chemistry Research* **10**, (2011).
65. Wabner, D. The peroxide value—a new tool for the quality control of essential oils. *Int. J. Aromather.* **12**, 142–144 (2002).
66. Turek, C. & Stintzing, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12**, 40–53 (2013).

## Anexo I: Representações gráficas dos resultados obtidos

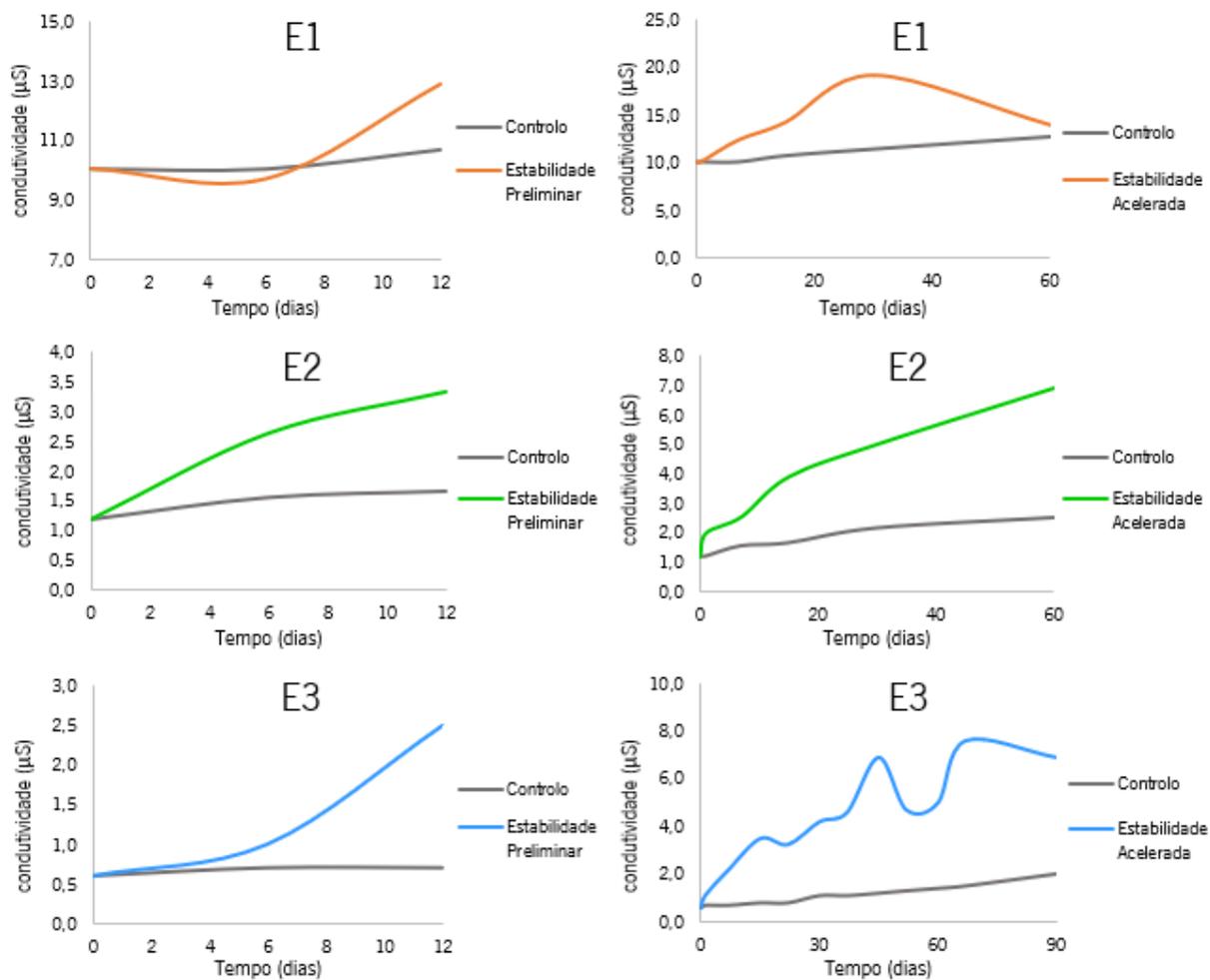
As seguintes figuras (Figura 27, Figura 28, Figura 29, Figura 30, Figura 31 e Figura 32) correspondem às representações gráficas dos valores de pH, condutividade e densidade obtidos ao longo dos ensaios de estabilidade preliminar e acelerada.



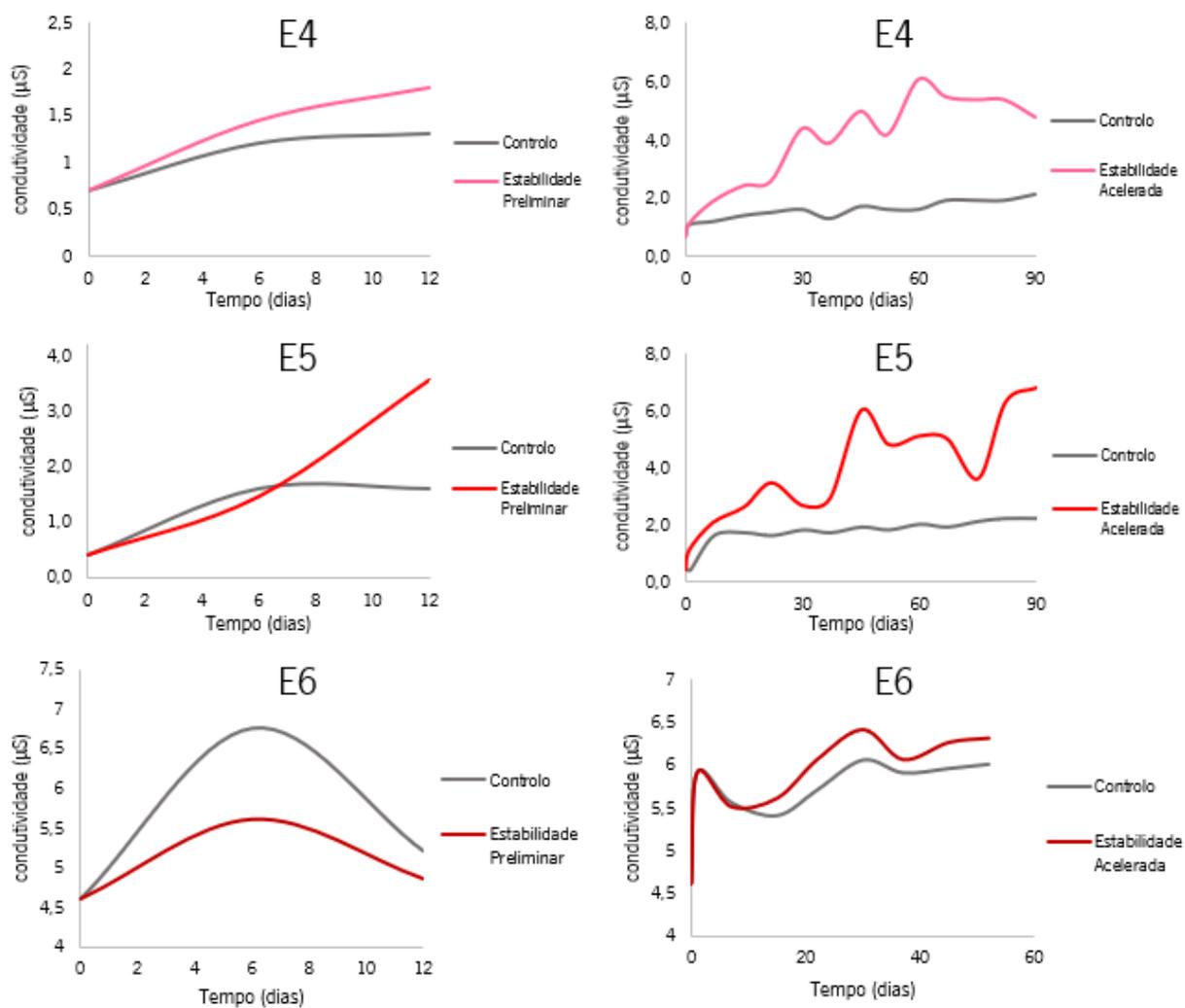
**Figura 27:** Representação gráfica dos valores de pH obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E1, E2 e E3).



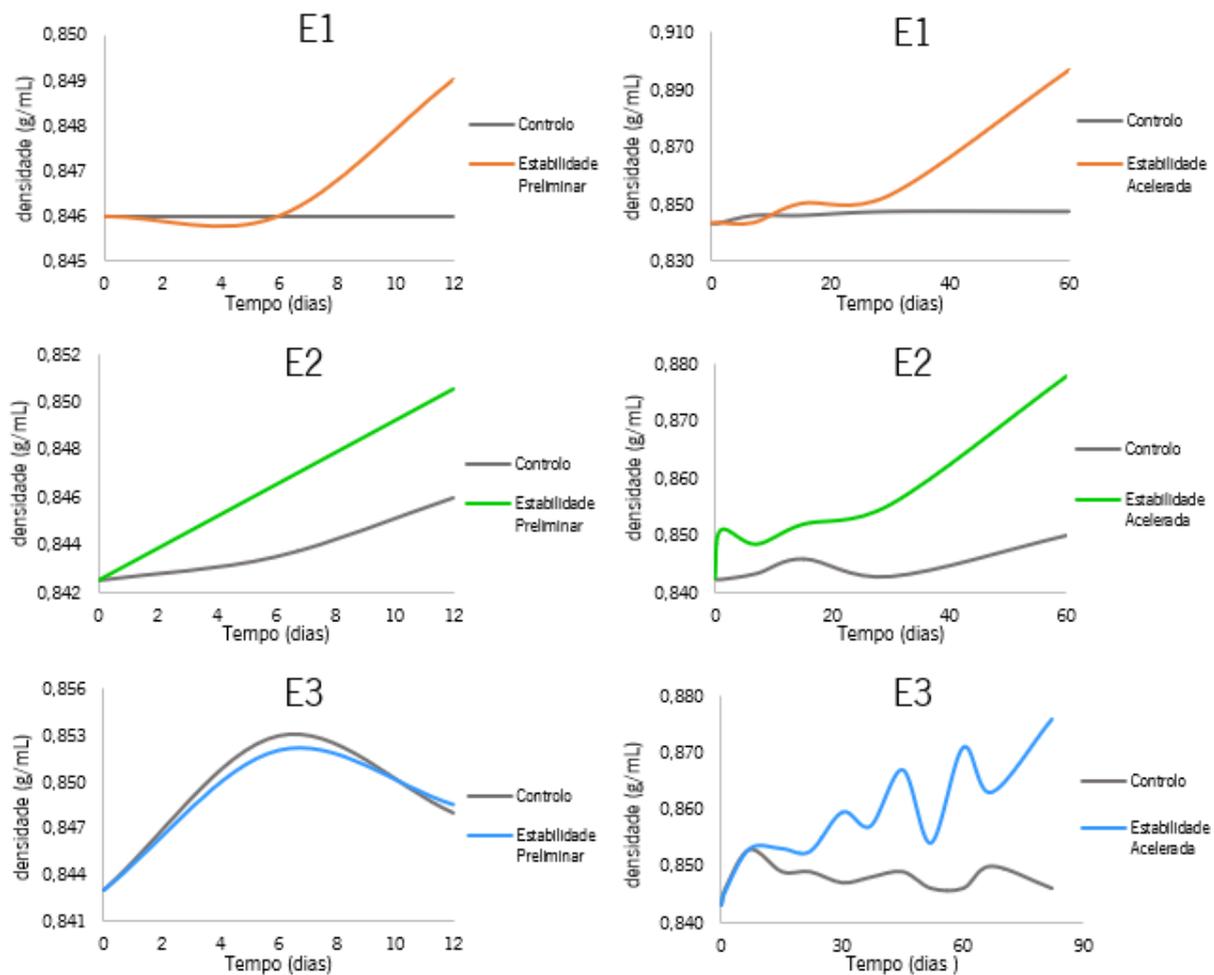
**Figura 28:** Representação gráfica dos valores de pH obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E4, E5 e E6).



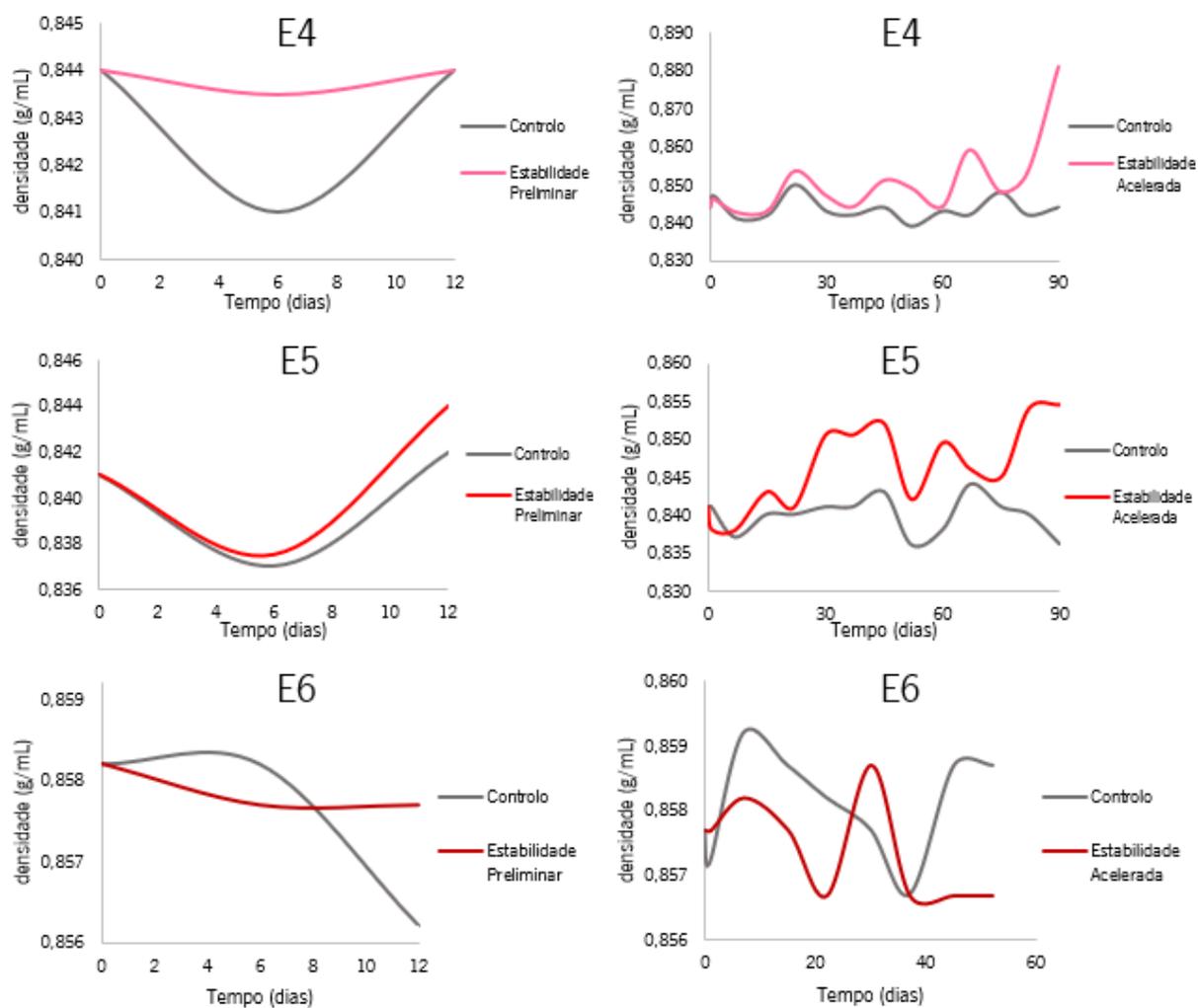
**Figura 29:** Representação gráfica dos valores de condutividade obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E1, E2 e E3).



**Figura 30:** Representação gráfica dos valores de condutividade obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E4, E5 e E6).

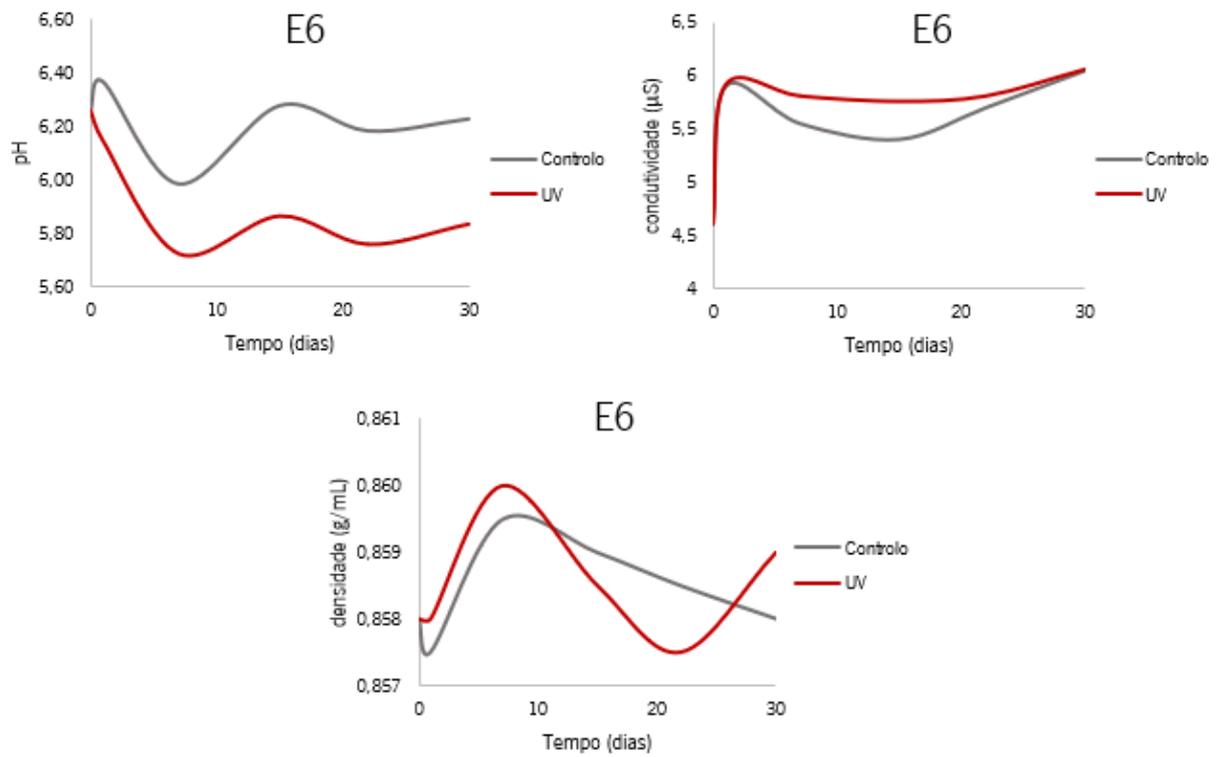


**Figura 31:** Representação gráfica dos valores de densidade obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E1, E2 e E3).



**Figura 32:** Representação gráfica dos valores de densidade obtidos nos testes de estabilidade preliminar e acelerada (amostras E4, E5 e E6).

A Figura 33 apresenta os resultados obtidos para os ensaios de estabilidade acelerada para a amostra E6 no que toca à avaliação da estabilidade à radiação UV.



**Figura 33:** Representação gráfica dos valores de pH, condutividade e densidade obtidos nos testes de estabilidade à radiação UV.