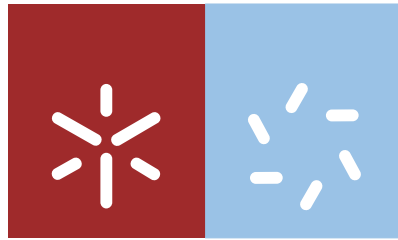


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Ana Elisabete da Silva Fernandes

## **Realização de estudos de conformidade de um teste rápido**



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Ana Elisabete da Silva Fernandes

## **Realização de estudos de conformidade de um teste rápido**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho realizado sob a orientação do  
**Engenheiro António Miguel Freitas da Costa**  
e da  
**Professora Doutora Maria Dulce Silva Geraldo**

Junho de 2012

## DECLARAÇÃO

**Nome:** Ana Elisabete da Silva Fernandes

**Endereço eletrónico:** pg16510@alunos.uminho.pt

**Título da tese de mestrado:** Realização de estudos de conformidade de um teste rápido

**Orientador(es):** Engenheiro António Miguel Freitas da Costa e Professora Doutora Maria Dulce Silva Geraldo.

**Ano de conclusão:** 2012

**Designação do Mestrado:** Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

Terminada mais uma etapa resta-me agradecer a todos que estiveram do meu lado durante este percurso contribuindo, direta ou indiretamente, com a sua ajuda e incentivo. Fica o meu sincero agradecimento:

À Universidade do Minho, e ao Departamento de Química da mesma pela oportunidade de realizar este trabalho.

À empresa Castro, Pinto & Costa, Lda e aos seus colaboradores por me receberem e tornarem a experiência bastante agradável. Em especial à Filipa, à Elisabete, à Ana e à Luísa pela ajuda e boa disposição mas também à Engenheira Inês pela disponibilidade e ajuda.

À Professora Doutora Dulce Geraldo, da Universidade do Minho, por ter aceitado orientar este projeto e pela sua incondicional dedicação, disponibilidade, apoio e boa disposição.

Ao Engenheiro Miguel Costa, da Castro, Pinto & Costa, por me ter aceitado para a realização deste estágio, proporcionando-me uma experiência aliciante, e também pela sua disponibilidade, ajuda e confiança.

Aos meus pais, porque sem eles nada disto seria possível, ao Gil e à Nanda e em especial ao Davide pelo apoio, compreensão, preocupação, encorajamento e por acreditarem em mim.

A todos os amigos e familiares que me acompanharam nesta caminhada académica sempre presentes para um momento de descontração.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei. Elas foram adversárias dignas e tornaram as minhas vitórias muito mais saborosas."

***Obrigada!***

*“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”*

**Ricardo Reis**

# REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE CONFORMIDADE DE UM TESTE RÁPIDO

## Resumo

A produção e venda de produtos fritos é uma atividade que envolve milhões de euros tornando-se fundamental o controlo rigoroso da qualidade destes produtos quer pela perspetiva económica quer pela questão da saúde pública. Diversos estudos realizados demonstraram que uma alimentação rica em gorduras ou óleos de fritura contendo um elevado teor em compostos polares leva a alterações graves no organismo. A legislação Portuguesa (Portaria 1135/95) proíbe o consumo de alimentos confeccionados em óleos de fritura contendo uma concentração de compostos polares superior a 25 %. Os compostos polares são indicadores de qualidade do processo de fritura e a avaliação da sua presença constitui uma medição direta da degradação do processo de fritura através de um método preciso e rigoroso baseado em cromatografia de adsorção, que é no entanto dispendioso e demorado. Assim, surgiu a necessidade de criar metodologias rápidas, confiáveis e económicas, na forma de testes rápidos. A Castro, Pinto & Costa, Lda. lançou, em 2002, o OleoTest® que permite o controlo de qualidade de óleos alimentares usados na fritura de forma rápida, segura e económica.

O trabalho aqui apresentado foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o desempenho do teste rápido OleoTest® comparando os resultados obtidos por este com os obtidos pela metodologia oficial. Para a elaboração deste trabalho foram recolhidas várias amostras em diferentes condições de degradação e de diferentes origens. A percentagem de compostos polares foi determinada em cada uma das amostras através do método oficial ISO 8420:2002 em paralelo com o teste rápido OleoTest®. O trabalho desenvolvido permitiu caracterizar o teste rápido OleoTest® quanto à sua robustez, estabilidade, fiabilidade e extensão do prazo de validade, sendo os resultados correlacionáveis com os resultados obtidos pelo método oficial. A aplicabilidade do OleoTest® foi analisada usando óleos de diferentes origens, demonstrando que este tem uma ampla aplicabilidade. Para além destes trabalhos, foi também avaliado o desempenho de doze formulações novas de modo a determinar se existia alguma melhoria nestas formulações em comparação com o desempenho atual do Oleotest®.

Assim, o estudo realizado permitiu concluir que o OleoTest® é um teste robusto, com resposta estável durante um longo período de tempo, rápido, simples e fiável para a determinação de compostos polares em óleos alimentares usados na fritura constituindo uma boa ferramenta para controlo da qualidade destes.

# PERFORMANCE STUDIES ON A RAPID TEST

## Abstract

The millions of euros involved in the frying industry increased to the need of a strict control of the quality of the products, whether for economic benefit or for public safety reasons. Several studies showed that a diet rich in fat or frying oil with a high content of polar compounds leads to severe abnormalities in the body. Portuguese legislation (Portaria 1135/95) prohibits the consumption of food cooked in frying oils containing a concentration of polar compounds exceeding 25%. The content of polar compounds indicates the quality of the frying process and its quantification through a precise and accurate method based on chromatographic adsorption, although expensive and time consuming, is a direct measurement of degradation of the frying process. Thus, the need to create fast, reliable and economic methodologies in the shape of rapid tests emerged. In 2002, Castro, Pinto & Costa, Lda company launched OleoTest® which allows the quality control of edible frying oils quickly, safely and with low costs.

The work presented here describes the evaluation of the performance of the OleoTest® quick test by comparing the results obtained through this method with those obtained with the official one. For this work several samples were collected in different conditions of degradation and from different sources. The percentage of polar compounds was determined in each sample by the official method ISO 8420:2002 in parallel with the OleoTest® quick test. This work allowed the characterization of the OleoTest® quick test for its robustness, stability and reliability, and expiration date, yielding results that correlate with the ones from the official method. The applicability of OleoTest® was assessed using oils of different origins, demonstrating that it has wide applicability. In addition to these studies, the performance of twelve new formulations was also evaluated in order to determine whether there was some improvement in these formulations compared to the current performance of Oleotest®.

Therefore, the study allowed to conclude that the test OleoTest® is robust, with long term stable response, fast, simple and reliable for the determination of polar compounds in edible oils used in frying making it a good tool of quality control.

# Índice Geral

|  |      |
|--|------|
| Agradecimentos .....   | iii  |
| Resumo.....  | v    |
| Abstract .....   | vi   |
| Índice Geral .....   | vii  |
| Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....   | ix   |
| Índice de figuras .....  | xi   |
| Índice de tabelas .....  | xiii |
| 1. Introdução.....   | 17   |
| 1.1. Enquadramento geral.....  | 17   |
| 1.1.1. O que são lípidos? .....  | 18   |
| 1.1.2. Óleos e gorduras de fritar .....  | 19   |
| 1.1.2.1. Óleos vegetais .....  | 19   |
| 1.1.2.2. Azeite.....   | 22   |
| 1.1.2.3. Outras gorduras.....  | 23   |
| 1.2. Mudanças químicas e físicas no óleo ou gordura durante a fritura .....          | 23   |
| 1.2.1. Transferência de massa e de calor .....                                       | 24   |
| 1.2.2. Reações químicas .....  | 25   |
| 1.2.2.1. Hidrólise .....   | 25   |
| 1.2.2.2. Oxidação.....   | 25   |
| 1.2.2.3. Reações térmicas.....   | 26   |
| 1.3. Efeitos do óleo e gordura de fritar na saúde .....                              | 27   |
| 1.3.1. Função dos AG no corpo humano.....  | 28   |
| 1.3.2. Problemas de saúde causados pelo processo de fritura.....                     | 29   |
| 1.4. Controlo de qualidade do processo de fritura .....                              | 30   |
| 1.4.1. Fatores que afetam a qualidade .....  | 31   |
| 1.4.2. Indicadores de qualidade .....  | 33   |
| 1.4.2.1. Indicadores físicos .....   | 33   |
| 1.4.2.2. Indicadores químicos.....   | 34   |
| 1.4.3. Determinação da qualidade dos óleos e gorduras de fritar – Testes Rápidos.... | 35   |
| 1.4.3.1. OleoTest <sup>®</sup> vs. o método oficial para a determinação de CPT ..... | 36   |
| 1.4.3.2. Outros testes rápidos .....   | 39   |
| 1.4.4. Legislação .....  | 40   |
| 1.5. Apresentação da empresa .....   | 41   |



|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.       | Parte experimental.....   | 45 |
| 2.1.     | Material, Equipamento e Reagentes.....                                    | 45 |
| 2.2.     | Amostragem.....   | 46 |
| 2.2.1.   | Amostras selecionadas.....  | 46 |
| 2.2.1.   | Preparação da amostra.....  | 46 |
| 2.2.2.   | Estudo de estabilidade das amostras.....                                  | 46 |
| 2.3.     | Determinação de Compostos Polares.....                                    | 48 |
| 2.3.1.   | Método oficial ISO 8420:2002.....   | 48 |
| 2.3.1.1. | Validação do método.....  | 48 |
| 2.3.2.   | Teste rápido OleoTest <sup>®</sup> .....                                  | 49 |
| 2.3.2.1. | Avaliação do desempenho do OleoTest <sup>®</sup> .....                    | 50 |
| 3.       | Apresentação e discussão dos resultados.....                              | 53 |
| 3.1.     | Estabilidade de analitos.....   | 53 |
| 3.2.     | Validação do método oficial ISO 8420:2002.....                            | 54 |
| 3.3.     | Avaliação do desempenho do teste rápido OleoTest <sup>®</sup> .....       | 57 |
| 3.3.1.   | Fiabilidade dos resultados do OleoTest <sup>®</sup> .....                 | 57 |
| 3.3.2.   | Robustez do método.....   | 60 |
| 3.3.2.1. | Influência da quantidade de mistura reacional e de amostra.....           | 61 |
| 3.3.2.2. | Influência do tempo de armazenamento.....                                 | 62 |
| 3.3.2.3. | Influência da origem da amostra.....                                      | 63 |
| 3.3.3.   | Estudo de validade.....   | 64 |
| 3.3.4.   | Desempenho do teste rápido com diferentes tipos de óleos ou gorduras..... | 66 |
| 3.3.4.1. | Óleo de canola e de palma.....  | 67 |
| 3.3.4.2. | Azeite.....   | 70 |
| 3.3.4.3. | Óleo de bagaço.....   | 71 |
| 3.4.     | Desenvolvimento de novas formulações de OleoTest <sup>®</sup> .....       | 73 |
| 3.4.1.   | Estudo das formulações.....   | 73 |
| 3.4.2.   | Aplicação das formulações em amostras de azeite.....                      | 75 |
| 3.4.3.   | Aplicação das formulações em amostras de óleo de bagaço.....              | 77 |
| 4.       | Conclusão.....  | 81 |
| 5.       | Referências.....  | 85 |
|          | Anexos.....   | 95 |
|          | Metodologia oficial versus OleoTest <sup>®</sup> : Custos e Tempo.....    | 95 |

## Abreviaturas, Siglas e Símbolos

|   |  |
|---|--|
| °C – Graus Célsio   | Lda – Limitada   |
| AG - Ácido gordo  | OT - OleoTest®   |
| TG - Triacilglicerol  | DFI – <i>Département fédéral de l'intérieur</i>                                    |
| Ex. – Exemplo   | PME – Pequena e média empresa  |
| C <sub>18:2</sub> , n-6 – Ácido linoleico                   | ASAE – Autoridade de segurança alimentar e económica                               |
| C <sub>18:2</sub> , n-3 – Ácido $\alpha$ -linolénico        | HACCP – Hazard analysis and critical control points                                |
| Máx. - Máximo   | ml - Mililitro   |
| Min.- Mínimo  | mm – Milímetro   |
| % - Percentagem   | mol - Mole   |
| m <sub>eq</sub> O <sub>2</sub> – Milequivalente de oxigénio | DPR – Desvio padrão relativo   |
| kg - Quilograma   | I & D – Investigação e Desenvolvimento   |
| AGL Ácidos gordos livres                                    | s – Desvio padrão  |
| CPT – Compostos polares totais                              | $\bar{x}$ – Média da grandeza medida   |
| kcal - Quilocaloria   | m <sub>i</sub> – Massa inicial do balão de fundo redondo                           |
| g - Grama   | m <sub>f</sub> – Massa final do balão de fundo redondo                             |
| mg - Miligrama  | m <sub>a</sub> – Massa da amostra  |
| VLDL – <i>Very low density lipoprotein</i>                  | V <sub>e</sub> – Vólum da solução da amostra eluída                                |
| HDL – <i>High density lipoprotein</i>                       | V <sub>t</sub> – Volume total da solução   |
| LDL – <i>Low density lipoprotein</i>                        | min - Minuto   |
| AVC – Acidente vascular cerebral                            | ER – Erro relativo   |
| DCV – Doenças cardiovasculares                              | $\mu$ - Valor considerado verdadeiro   |
| UV - Ultravioleta   | t <sub>exp</sub> – Valor de <i>t</i> de <i>student</i> calculado experimentalmente |
| IV - Infravermelho  | n – Número de determinações realizadas   |
| ISO – <i>International Organization of Standardization</i>  |  |
| CPC – Castro, Pinto & Costa, Lda                            |  |

**$t_{\text{tab}}$**  – Valor de  $t$  de *student* tabelado

**$CV_R$**  – Coeficiente de variação de reprodutibilidade

**R** – Limite de reprodutibilidade

**$S_{ri}$**  – Variância de reprodutibilidade

**$x$**  – Grandeza de medição

**$u_c(x)$**  – Incerteza padrão combinada da grandeza de medição

**$u(x)/x$**  – Incerteza padrão relativa

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> Estrutura geral dos ácidos gordos. a) Ácido gordo saturado; b) ácido gordo insaturado na conformação cis (10). .....   | 18 |
| <b>Figura 2</b> Esquema das mudanças que ocorrem durante o processo de fritura. <i>Adaptado de Fritsch (1981) (31)</i> . .....   | 24 |
| <b>Figura 3</b> Esquema do mecanismo de oxidação térmica (30). .....   | 26 |
| <b>Figura 4</b> Esquema da variação da qualidade do óleo com o tempo de aquecimento (70) .....   | 31 |
| <b>Figura 5</b> Ilustração de um OleoTest® e indicação da quantidade de mistura reacional, da quantidade de amostra que deve ser usada e do volume total do teste. ....  | 49 |
| <b>Figura 6</b> Fotografia dos testes OT realizados na avaliação de cinco amostras. ....   | 58 |
| <b>Figura 7</b> Fotografia dos testes A realizados na avaliação de cinco amostras. ....  | 59 |
| <b>Figura 8</b> Fotografia tirada aos testes A realizados na análise das amostras U1, U2, U3, U4 e U5 após 24h. ....   | 60 |
| <b>Figura 9</b> Fotografias obtidas nos dias da análise, dos testes rápidos para avaliar a influência da quantidade de mistura reacional na resposta do teste da amostra: a) U1; b) U5. <i>Esquerda para a direita: 0,6ml, 0,8ml e 1,6ml de mistura reacional</i> . ....   | 61 |
| <b>Figura 10</b> Fotografias obtidas no dia da análise, dos testes rápidos realizados para avaliar a influência da quantidade de óleo na resposta do teste da amostra: a) U1; b) U5. <i>Esquerda para a direita: 5 ml, 2,5 ml e 7 ml de amostra</i> . ....   | 62 |
| <b>Figura 11</b> Fotografias dos testes rápidos para avaliar a estabilidade destes ao longo do tempo do lote: a) OT100530, que está dentro do prazo de validade, obtidas no momento da realização dos testes; b) OT100530, que está dentro do prazo de validade, obtidas um mês depois da realização dos testes; c) OT000339, que está fora do prazo de validade, obtidas no momento da realização dos testes; d) OT000339, que está fora do prazo de validade, obtidas um mês depois da realização dos testes. .... | 62 |
| <b>Figura 12</b> Fotografia de duas amostras representativas do nível 4 do OleoTest® (entre 17% e 21%). Amostra U4 foi obtida através de um processo de fritura descontínua enquanto a amostra U7 foi obtida através de um processo de fritura contínua. ....  | 63 |
| <b>Figura 13</b> Fotografias obtida no momento de realização dos testes de a) amostras virgens; b) de diferentes níveis de degradação da amostra PC01; c) de diferentes níveis de degradação da  |    |

|  |    |
|--|----|
| amostra PH01; d) de diferentes níveis de degradação da amostra OS01; e) de diferentes níveis de degradação da amostra OP01.....  | 68 |
| <b>Figura 14</b> Fotografias das amostras FG01 e FP01 a) no momento do teste; b) 15 minutos após realização dos testes.....  | 69 |
| <b>Figura 15</b> Fotografia obtida um mês depois dos testes terem sido realizados com as amostras virgens.....   | 70 |
| <b>Figura 16</b> Fotografia dos testes realizados nas amostras de azeite A01, A02 e A03.....   | 71 |
| <b>Figura 17</b> Fotografia tirada aos testes realizados às amostras de óleo de bagaço.....  | 72 |
| <b>Figura 18</b> Fotografias representativas dos testes OT com as novas formulações desenvolvidas, denominadas de A2, A4, A8, B2, B4, B8, C2, C4, C8, D2, D4 e D8.....   | 73 |
| <b>Figura 19</b> Fotografias obtidas aos testes das diferentes fórmulas realizados para analisar cinco amostras com formulações distintas: A) A4; B) B4; C) C4; D) OT.....   | 74 |
| <b>Figura 20</b> Fotografias dos testes realizados para analisar azeite virgem com as diferentes formulações desenvolvidas (da esquerda para a direita): A) A2, A4 e A8; B) B2, B4 e B8; C) C2, C4 e C8; D) D2, D4 e D8..... | 75 |
| <b>Figura 21</b> Fotografias dos testes realizados para analisar três amostras de azeite em diferentes níveis de degradação, com formulações diferentes: A) A2; B) A8 e C) A4.....   | 76 |
| <b>Figura 22</b> Fotografias dos testes realizados para analisar três amostras de azeite em diferentes níveis de degradação com diferentes formulações: A) D2; B) D4 e C) D8.....  | 76 |
| <b>Figura 23</b> Fotografias dos testes realizados para analisar três amostras de azeite em diferentes níveis de degradação com as formulações: A) B4 e B) C4.....   | 77 |
| <b>Figura 24</b> Fotografias dos testes realizados para analisar seis amostras de óleo de bagaço em diferentes níveis de degradação com as formulações: A) A4; B) B4 e C) C4.....  | 78 |

## Índice de tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela I</b> Composição de AG em alguns óleos de fritar (17).....  | 20 |
| <b>Tabela II</b> Características recomendadas para óleos de fritar (20).....  | 21 |
| <b>Tabela III</b> Recomendações da quantidade diária ingerida de calorias, gorduras e AG saturados para adultos e crianças (17).....  | 28 |
| <b>Tabela IV</b> Requisitos de um teste rápido adequado (2, 51, 79).....  | 36 |
| <b>Tabela V</b> Resposta apresentada pelo OT mediante a percentagem de CPT presente na amostra. ....  | 38 |
| <b>Tabela VI</b> Quadro resumo de alguns testes rápidos disponíveis no mercado (2, 73, 101).....  | 40 |
| <b>Tabela VII</b> Países que controlam a qualidade do óleo de fritar e os respectivos parâmetros, limites e legislações utilizadas.....   | 41 |
| <b>Tabela VIII</b> Equipamentos utilizados no trabalho laboratorial.....  | 45 |
| <b>Tabela IX</b> Material de vidro e outro material, e respetiva incerteza associada, utilizado no trabalho laboratorial.....   | 45 |
| <b>Tabela X</b> Fórmula química, marca e outras informações relativas aos solventes e materiais utilizados no trabalho laboratorial.....  | 45 |
| <b>Tabela XI</b> Algumas características das amostras analisadas no âmbito deste trabalho.....  | 47 |
| <b>Tabela XII</b> Resultados da análise de CPT pelo método ISO de duas amostras, U1 e U4, na altura da recolha (tempo 0) e seis meses depois (tempo 1) com determinação do desvio padrão relativo (DPR) de estabilidade do analito para cada amostra.....   | 53 |
| <b>Tabela XIII</b> Resumo dos resultados estatísticos obtidos na análise de duas amostras, nomeadamente a percentagem de CPT para cada réplica e a respetiva média, a variância de reprodutibilidade ( $S_{Ri}$ ), o coeficiente de variação de reprodutibilidade ( $CV_R$ ) e o limite de reprodutibilidade (R).....   | 54 |
| <b>Tabela XIV</b> Resultados da análise de CPT de uma amostra de referência, AF995, e os respetivos parâmetros de desempenho: justeza, determinada pela avaliação dos erros sistemáticos, <i>t-student</i> experimental ( $t_{exp}$ ) e <i>t-student</i> tabelado ( $t_{tab}$ ), e do erro relativo (ER), e a precisão, determinada pela avaliação do desvio padrão relativo (DPR)..... | 55 |
| <b>Tabela XV</b> Percentagem de CPT de uma mesma amostra usando o método ISO, mas variando a velocidade do fluxo de eluição acompanhado pelo coeficiente de variação de reprodutibilidade ( $CV_R$ ).....   | 56 |
| <b>Tabela XVI</b> Quadro resumo das fontes de incerteza que afetam o resultado obtido pelo método ISO para uma amostra exemplo, apresentando a respetiva grandeza (x), a sua  |    |

|   |    |
|---|----|
| incerteza combinada ( $u_c(x)$ ) e relativa ( $u(x)/x$ ) e incluindo a representação gráfica das componentes da incerteza.....  | 57 |
| <b>Tabela XVII</b> Amostras usadas na avaliação do desempenho do OT acompanhadas pela respectiva percentagem de CPT determinada pelo método ISO 8420:2002 e pelo resultado do OT.....   | 58 |
| <b>Tabela XVIII</b> Resposta apresentada pelo teste rápido A de determinação de CPT mediante a percentagem de CPT presente na amostra.....  | 59 |
| <b>Tabela XIX</b> Percentagem de compostos polares em cinco amostras, determinada através do método ISO 8420:2002 (método oficial) e dos testes rápidos OT e A.....   | 59 |
| <b>Tabela XX</b> Resumo dos resultados obtidos pelos vários testes dos diferentes lotes para as diferentes amostras, acompanhados por comentários e fotografias dos testes realizados.....  | 64 |
| <b>Tabela XXI</b> Percentagem de compostos polares nas amostras de óleos de canola e palma, determinado através do método ISO 8420:2002 (método oficial) e pelo teste rápido OT.....  | 67 |
| <b>Tabela XXII</b> Percentagem de compostos polares nas amostras de azeite, determinado através do método ISO 8420:2002 (método oficial) e pelo OT.....   | 70 |
| <b>Tabela XXIII</b> Percentagem de compostos polares nas amostras de óleo de bagaço, determinado através do método ISO 8420:2002 (método oficial) e pelo OT.....  | 71 |
| <b>Tabela AI</b> Custo associado ao método ISO 8420:2002, tendo em conta a sua implementação, custo por cada análise, considerando que em cada análise são realizadas duas réplicas, e o custo de reposição do <i>stock</i> ..... | 95 |
| <b>Tabela AII</b> Tempo de execução das diversas etapas do método ISO 8420:2002.....  | 96 |

• • •

# Introdução

• • •





# 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento geral

O processo de fritura é um dos métodos de preparação de alimentos mais antigos e começou a ser utilizado, supostamente, na China como forma de pré-cozinhar os alimentos. No entanto, foi perto de 1950, com o desenvolvimento de tecnologias mais adequadas, que o processo de fritura se começou a assemelhar ao que é conhecido hoje. Atualmente é muito usual fritar alimentos, pois é um processo simples e rápido, para além de conferir propriedades sensoriais únicas de sabor, cor e textura. Este pode ser definido como o ato de emergir comida em óleo quente havendo contacto entre estes e o ar a uma temperatura elevada (150°C - 190°C) **(1-3)**.

O consumo de alimentos fritos nos últimos anos aumentou devido ao crescimento das redes de *fast-food*, impulsionado por condições sociais, económicas e técnicas **(4, 5)**. O leque de produtos que podem ser fritos é muito vasto, podendo ser usadas batatas, carne, peixe, fruta ou mesmo queijo. Durante o processo de fritura há transferência de calor e massa entre o óleo, os alimentos e o ar sendo esta transferência responsável pelas diversas modificações que produzem comida tão apetecível. Os mesmos processos que levam às modificações apelativas para o consumidor, também podem produzir modificações prejudiciais à saúde humana. Dessa forma, há uma crescente preocupação sobre o efeito da fritura na qualidade dos alimentos e a sua posterior influência na saúde humana **(6)**. Assim, torna-se importante o controlo rigoroso do óleo de fritar e do processo de fritura de modo a reduzir ou eliminar a presença de compostos prejudiciais para a saúde humana nos alimentos fritos.

De uma maneira geral, o processo de fritura pode ser classificado em dois tipos, o industrial e o de restauração, que são diferenciados pelo processo de fritura contínuo ou descontínuo, respetivamente **(7)**. Na fritura contínua o alimento está completamente submerso e o processo não é interrompido, assim o óleo é sujeito sempre à mesma temperatura, e normalmente sempre ao mesmo tipo de alimento, apenas se vai acrescentando óleo quando necessário. Este é usado para a produção *snacks* e alimentos pré-fritos, entre outros. Na restauração é usada a fritura descontínua em que o óleo de fritar é sujeito a ciclos de temperatura e a diferentes tipos de alimentos, o que pode acelerar a degradação do óleo **(8)**. Para além disto, a fritura pode ser realizada com a imersão total do alimento, normalmente para uso industrial, mas por outro lado quando para uso doméstico a fritura pode também ser realizada com o alimento à superfície do óleo **(5, 9)**.

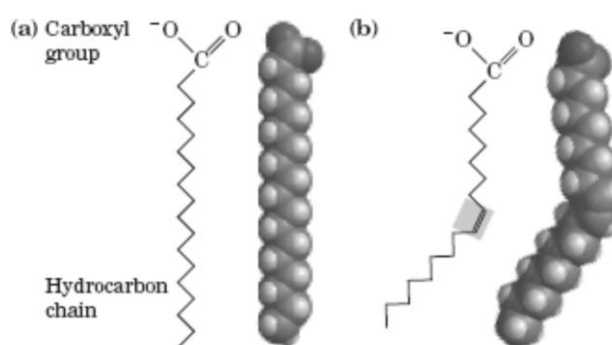
O desempenho do processo de fritura é altamente dependente do tipo de gordura utilizado, podendo ser usados óleos e gorduras não hidrogenadas ou hidrogenadas, sólidas ou

líquidas à temperatura ambiente, entre outras **(2)**. Considerando o papel que os óleos e gorduras possuem na alimentação e a importância nutricional que estes apresentam, o seu estudo é bastante importante.

### 1.1.1. O que são lípidos?

Os lípidos são um grupo de moléculas biológicas quimicamente diversas e com diferentes funções, no entanto todas elas são insolúveis em água. Os óleos e gorduras são a principal forma de armazenamento de energia no organismo humano fazendo parte dos lípidos de armazenamento. Os ácidos gordos (AG) são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarbonetos e é destes que os óleos e gorduras derivam **(10)**.

As cadeias de hidrocarbonetos e ácidos carboxílicos são ligações entre elementos de carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O), sendo estes responsáveis pela variação da estrutura dos AG. Os átomos de C ligam-se entre si, formando cadeias ou anéis, através de ligações químicas e partilham um, dois ou três pares de eletrões, que originam ligações simples, duplas ou triplas, respetivamente. Assim, a estrutura de um AG é diferente conforme a sua cadeia de hidrocarbonetos, pois esta pode ter diferentes ligações químicas, o que influencia nas propriedades físicas, como a solubilidade e o ponto de fusão, e pode também ter diferentes comprimentos, possuindo normalmente entre três e vinte e quatro átomos de C. A figura 1 representa a estrutura geral de um AG saturado e de um AG insaturado na conformação *cis* **(10, 11)**.



**Figura 1** Estrutura geral dos ácidos gordos. a) Ácido gordo saturado; b) ácido gordo insaturado na conformação *cis* **(10)**.

A saturação das cadeias de hidrocarbonetos é caracterizada pelo tipo de ligação química entre átomos de C e é responsável pelas diferentes interações entre moléculas de AG. As cadeias de hidrocarbonetos saturadas não contêm ligações duplas, sendo por isso mais flexíveis podendo associar-se entre si através de interações hidrofóbicas (Figura 1a). Por outro lado, as cadeias insaturadas possuem ligações duplas que tornam a molécula relativamente reativa e quimicamente instável. As cadeias insaturadas podem possuir mais do que uma ligação dupla sendo denominadas de cadeias poliinsaturadas. Estas cadeias podem ter duas conformações, a *cis* (Figura 1b), que ocorre naturalmente, e a *trans* que é normalmente produzida em animais ruminantes mas também durante a hidrogenação de peixe e óleos alimentares **(10-12)**.

Os AG, apesar de poderem existir na sua forma livre, normalmente agrupam-se formando outras formas de lípidos. As moléculas mais simples são os triacilgliceróis (TG), também chamados de óleos e gorduras, que são compostos por três moléculas de AG, não necessariamente iguais, ligadas a uma molécula de glicerol através de ligações éster. Os TG podem variar a sua forma molecular no entanto são sempre moléculas não polares, hidrofóbicas e essencialmente insolúveis em água, e são armazenados em gotículas de gordura em células adiposas do corpo humano **(10-12)**. Os TG são armazenados na forma de óleos em sementes de várias plantas e fornecem energia e precursores para o desenvolvimento destas. As moléculas de glicerol e de AG são as mesmas independentemente da origem, animal ou vegetal, variando apenas a composição das moléculas de TG **(11)**.

### **1.1.2. Óleos e gorduras de fritar**

Diferentes tipos de óleos e gorduras podem ser utilizados para fritar alimentos, podendo variar a sua origem, estado físico e composição química, entre outras coisas. Em todo o mundo existem diferentes dietas alimentares que estão intrinsecamente ligadas à cultura do país, sendo que cada país tem um óleo ou gordura que é mais usada na fritura. Atualmente, o óleo vegetal é o mais usado de um modo geral devido ao valor nutricional benéfico associado a este **(13)**. No entanto, outras gorduras alimentares são também usadas e começam a ganhar espaço na indústria da fritura devido à incessante procura de novas formas de produzir alimentos mais saudáveis. Os óleos e gorduras vegetais são distinguidos pelo seu estado físico a 20°C, sendo que o primeiro é líquido e o segundo sólido, e são obtidos a partir de frutos ou sementes **(14)**.

#### **1.1.2.1. Óleos vegetais**

Os óleos vegetais derivam de óleos refinados, branqueados e desodorizados e podem ser obtidos a partir de sementes ou da polpa de frutos. Estes são produzidos principalmente de oleaginosas (ex: semente de girassol), legumes (ex: soja), frutos secos (ex: amendoim) e de algumas frutas (ex: azeitona). As gorduras naturais encontradas nos óleos vegetais são misturas complexas de diferentes formas de TG, normalmente com AG insaturados sendo por isso líquidos à temperatura ambiente **(10)**. Os óleos vegetais contêm também quantidades apreciáveis de vitamina E, na forma de tocoferóis e tocotrienóis, assim como de esteróis e compostos minoritários, como escaleno e esfingolípidos. Estes compostos são responsáveis pelas propriedades benéficas dos óleos vegetais **(15)**.

A composição e a proporção em AG diferem em cada óleo (tabela I), alterando a estabilidade assim como a funcionalidade do óleo vegetal. A estabilidade é característica de cada óleo e é altamente dependente do grau de insaturação dos AG, sendo que a maior parte

dos óleos utilizados para fritar são ricos em AG monoinsaturados e polinsaturados **(16)**. A forma livre de AG oxida-se com mais facilidade, estando presente apenas em pequenas quantidades e não tendo um efeito proeminente na estabilidade dos óleos de fritar.

**Tabela I** Composição de AG em alguns óleos de fritar **(17)**.

|                  | Gordura total (%) | AG saturados (%) | AG monoinsaturados (%) | AG polinsaturados (%) |
|------------------|-------------------|------------------|------------------------|-----------------------|
| Óleo de girassol | 99,9              | 12,0             | 20,5                   | 63,3                  |
| Óleo de canola   | 99,9              | 6,6              | 59,3                   | 29,3                  |
| Azeite           | 99,9              | 14,3             | 73,0                   | 8,2                   |
| Óleo de milho    | 99,9              | 14,4             | 29,9                   | 51,3                  |
| Óleo de soja     | 99,9              | 15,6             | 21,3                   | 58,8                  |
| Óleo de palma    | 99,9              | 47,8             | 37,1                   | 10,4                  |

A maior parte dos AG são sintetizados no corpo humano, mas existem dois grupos de AG necessários para o normal funcionamento do corpo humano, chamados de AG essenciais, que não são produzidos mas adquiridos na alimentação, os AG ômega-3 e os AG ômega-6. O ácido linoleico ( $C_{18:2}$ , n-6), que se insere no grupo de AG ômega-6, e o ácido  $\alpha$ -linolênico ( $C_{18:3}$ , n-3), que se insere no grupo de AG ômega-3, são dois AG que podem ser adquiridos através dos óleos vegetais **(11, 18)**. Estes intervêm na manutenção da estrutura da membrana celular e são precursores de eicosanóides, que são muito importantes na prevenção contra problemas cardíacos **(10)**.

Normalmente, os óleos de fritar passam por processos químicos que conferem determinadas características necessárias para diversas aplicações. Um processo comumente utilizado é a hidrogenação que satura ligações duplas dos TG originalmente presentes nos óleos polinsaturados, de modo a alterar características de fusão e solidificação e assim obter um óleo com ponto de fusão mais elevado. Este processo pode gerar óleos com tempo de armazenamento maior, ricos em AG monoinsaturados e maior resistência à autoxidação, mas no entanto com maior percentagem de AG *trans* **(11, 19)**. A interesterificação é um outro processo que altera propriedades físicas e funcionais dos óleos através de um rearranjo do grupo acil dos TG, que resulta num aumento do ponto de fusão. Este processo possui um problema semelhante à hidrogenação que é a produção de AG *trans* **(19)**. Outro processo é o fracionamento que consiste na separação de gordura sólida numa fração mais líquida que a origem e numa fração mais sólida que a origem, e é feito através de processos de cristalização. O fracionamento é realizado para melhorar pontos de fusão, estabilidade e aparência dos óleos. O inconveniente deste processo é que muda o perfil dos TG, produzindo mais AG *trans*, e a segregação de alguns componentes **(19)**.

A fritura é um processo aplicado facilmente no dia-a-dia, mas para além disso existe uma indústria desenvolvida para a produção de diversos produtos como pré-fritos congelados, assim como restaurantes que recorrem muito a este processo. Dessa forma, a escolha do óleo de fritar deve ser cuidadosamente pensada e programada de modo a ser vantajosa para o produtor e saudável para o consumidor. A adequabilidade do óleo de fritar está dependente do tipo de produtos, condições de fritura, posterior processamento e armazenamento. Para uso em escala industrial esta escolha deve ter em consideração o valor nutricional do óleo, condições do processo de fritura, o objetivo do produto (uso imediato ou congelado), o custo do óleo, o seu impacto ambiental e o mais importante, a sua estabilidade térmica **(20)**. A tabela II ilustra algumas das especificações mínimas às quais os óleos de fritar devem respeitar.

**Tabela II** Características recomendadas para óleos de fritar **(20)**.

| <b>Critério</b>                | <b>Especificação</b>          |
|--------------------------------|-------------------------------|
| <b>Cor</b>                     | Clara                         |
| <b>Sabor</b>                   | Sem                           |
| <b>Agente anti-espuma</b>      | Máx. 10mg/kg                  |
| <b>AGL</b>                     | Máx. 0,1                      |
| <b>Valor de Peróxido</b>       | Máx. 1 meq O <sub>2</sub> /kg |
| <b>Ponto de fumo</b>           | Min. 220°C                    |
| <b>Humidade</b>                | Máx. 0,1%                     |
| <b>Ácido Linoleico</b>         | Máx. 2%                       |
| <b>Ponto de fusão</b>          | De acordo com a aplicação     |
| <b>Metais pesados</b>          | Máx. 0,1 mg/kg                |
| <b>Matéria volátil a 105°C</b> | Máx. 0,2%                     |
| <b>Conteúdo de sabão</b>       | Máx. 0,005%                   |
| <b>Impurezas insolúveis</b>    | Máx. 0,05%                    |

Existe uma vasta gama de diferentes óleos vegetais com diferentes características que podem ser usados para fritar alimentos. Sendo que as características a que devem obedecer os óleos e gorduras vegetais destinados à alimentação humana estão definidas no Diário da República Portaria nº 928/98 **(14)**. Em 2008 os óleos vegetais mais vendidos eram o óleo de palma, óleo de girassol, óleo de soja e o óleo de canola **(17)**.

### *Óleo alimentar*

O óleo alimentar é o mais vulgarmente utilizado para fritar, pois este é mais barato e corresponde às necessidades básicas da fritura. Este é uma mistura de dois ou mais óleos

(excluindo o azeite) que são refinados isoladamente ou em conjunto. A qualidade deste óleo é comprometida pelo facto de ser aplicado um processo de refinamento **(21, 22)**.

#### *Óleo de bagaço*

O óleo de bagaço é um derivado da produção do azeite, sendo por isso um produto da *Olea europea* L, vulgarmente azeitona. Este é produzido a partir da gordura que permanece presa aos restos de extração de azeite extra virgem e refinado, e de resíduos dos caroços e peles das azeitonas. O óleo de bagaço é produzido através de processos químicos que envolvem solventes e temperaturas elevadas que levam à formação de compostos tóxicos e assim a uma perda de qualidade do óleo **(23)**. No entanto, este mantém grande parte do ácido oleico, antioxidantes naturais e compostos com funções preventivas em relação às trombooses. A sua utilização em processos de fritura é apelativa devido ao seu baixo custo, estabilidade em elevadas temperaturas e um ponto de fumo perto dos 220°C **(24)**.

#### *Óleo de canola*

O óleo de canola é obtido das sementes de *Brassica*, vulgarmente sementes de colza. Inicialmente as sementes de colza davam origem a um óleo de colza sem nenhum tratamento que tinha quantidades elevadas de ácido erúxico. Atualmente, o óleo extraído das sementes de colza é tratado dando origem a um óleo com baixa quantidade de ácido erúxico e baixo teor de glucosinolato, o óleo de canola. Esta modificação melhorou a sua performance durante a fritura, com um ponto de fumo de aproximadamente 220°C, melhorou a estabilidade durante o armazenamento e aumentou a quantidade de ácido oleico presente **(25)**.

#### *Óleo de palma*

O óleo de palma é derivado da gordura de palma que é obtida diretamente do mesocarpo carnudo do fruto da palmeira de dendém (*Elaeis guineensis* Jacq). Este fruto tem um elevado teor em óleo não sendo necessário usar processos químicos para a extração do óleo. O óleo de palma é muito rico em carotenos possuindo por isso uma cor alaranjada. Este é rico em AG saturados, principalmente ácido palmítico, o que pode não ser muito benéfico para a saúde humana. Para atenuar algumas características deste óleo, este é sujeito a diversos processos de produção **(21, 22, 26)**.

#### **1.1.2.2. Azeite**

O azeite, em muitos países chamado de óleo de azeitona, é muito usado nas dietas mediterrâneas desde a antiguidade. Este é muito usado para temperar refeições e também para fritar, no entanto queima a temperaturas mais baixas do que os óleos vegetais. O azeite é obtido do fruto da oliveira *Olea europea* L, vulgarmente azeitona, cuja polpa pode conter entre 30 a 70% de óleo. No entanto, este possui uma composição química que o separa dos óleos

vegetais usuais, pois o azeite é rico em AG monoinsaturados, como o ácido oleico, e possui provitamina A e vitamina E. Os AG monoinsaturados regulam os níveis de colesterol e ajudam a reduzir o risco de problemas cardíacos. O azeite possui características únicas pois contém compostos com diferentes atividades antioxidantes, como compostos polifenólicos **(27)**.

Outra diferença muito importante é o processo de obtenção do azeite virgem, pois este é obtido por processos de pressão, não sendo necessários processos de refinação. Este facto faz com que o azeite retenha maiores quantidades de componentes bioativos importantes que estavam presentes na azeitona. No entanto, o azeite pode não ser virgem podendo ser uma mistura refinada de diferentes azeites virgens, ou seja, tratados quimicamente, o que diminui a qualidade do azeite. Estes azeites estão cada vez mais a ser utilizados na fritura devido aos seus preços mais reduzidos. A qualidade do azeite virgem depende de vários fatores, principalmente relacionados com o fruto, como as condições, tempo de colheita e o acondicionamento deste **(16, 28)**.

### **1.1.2.3. Outras gorduras**

Com o desenvolvimento da sociedade, cresce a exigência com a qualidade dos alimentos produzidos. Atendendo a essa situação, tem havido desenvolvimento de novas formulações de óleos ou gorduras que possam ser usadas para fritar. Os principais objetivos dessas novas formulações passam por manter as características benéficas dos óleos e gorduras pré-existentes e aumentar a estabilidade destes durante a fritura. Os óleos e gorduras desenvolvidos são normalmente mais saudáveis pois são selecionados os AG mais benéficos, que incorporam a classe dos ómeegas 3 e 6, e possuem características físicas que facilitam a fritura **(6)**.

## **1.2. Mudanças químicas e físicas no óleo ou gordura durante a fritura**

A fritura é um processo conveniente para o processamento dos alimentos, no entanto durante este processo ocorrem várias modificações no meio de fritura (figura 2). A transferência simultânea de calor e massa, a absorção de óleo, a perda de humidade e as reações que ocorrem durante a fritura tornam o processo de fritura muito complexo **(29-31)**. As reações que ocorrem podem ser térmicas, oxidativas ou hidrolíticas formando compostos que modificam química e fisicamente o óleo e gorduras usadas podendo chegar a um ponto em que não é possível obter alimentos com qualidade. Tudo isto acoplado às diferentes variáveis de fritura que podem ser consideradas, como condições de fritura ou tipo de alimento, dificulta o estudo rigoroso sobre as mudanças que o óleo e gordura sofre durante a fritura **(3, 31, 32)**.



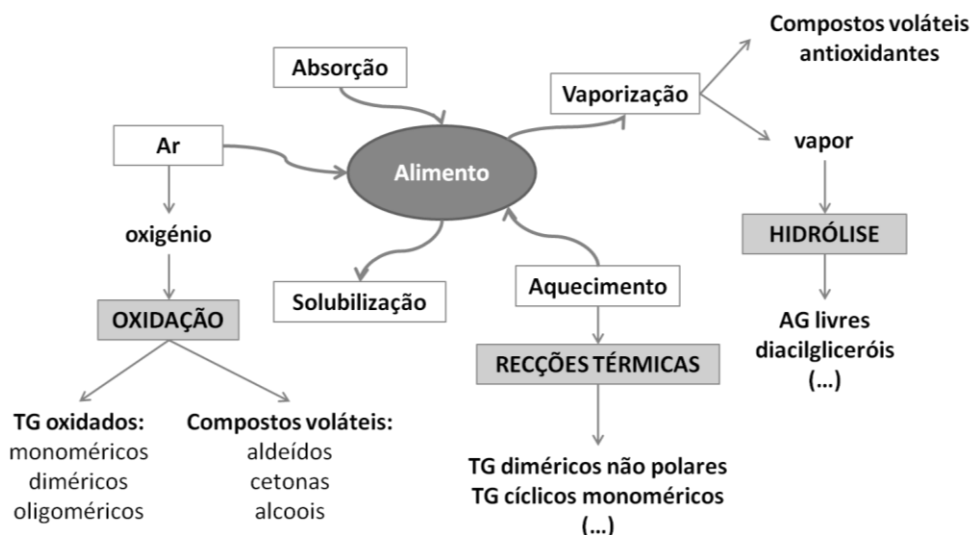


Figura 2 Esquema das mudanças que ocorrem durante o processo de fritura. Adaptado de Fritsch (1981) (31).

### 1.2.1. Transferência de massa e de calor

A transferência de massa e de calor provocam principalmente mudanças físicas, como a desidratação, destilação e extração, que contribuem para a composição final e especialmente para a textura e o sabor dos alimentos fritos. As propriedades físico-químicas do alimento e do óleo, assim como a geometria dos alimentos e temperatura do óleo afetam a transferência de massa e calor (30).

As principais formas de transferência de massa são a perda de água e a absorção de óleo por parte dos alimentos (3, 30). Ouchon e os seus colaboradores (2003) mostraram que normalmente apenas uma pequena quantidade de óleo é absorvida, indicando que a absorção de óleo e a perda de água não são fenômenos sincronizados (33). A perda de água começa logo que o alimento é adicionado ao óleo fazendo com que a temperatura do óleo diminua mas que a temperatura do alimento aumente lentamente. O vapor criado por essa perda de água limita a absorção de óleo à superfície da comida, fazendo com que o alimento possua uma superfície desidratada, onde as principais alterações ocorrem, e um centro com temperaturas não superiores a 100°C (3, 30).

O óleo cria um ambiente favorável para a transferência de calor devido à sua densidade e elevado ponto de ebulição. A quantidade de óleo absorvido pelo alimento é muito influenciada pelo próprio alimento, pois cada um tem a sua própria estrutura de superfície, composição, humidade, conteúdo lipídico, formato e porosidade (34). O alimento pode ainda ter a sua superfície modificada com pão ou massa o que altera a quantidade de água dissipada e de óleo absorvido. Assim é muito difícil de prever a absorção de óleo por parte dos alimentos pois existem imensas variáveis, podendo a quantidade de óleo absorvido variar entre 6% e 40% (20, 35). A temperatura é um parâmetro muito importante que deve ser controlado, pois elevadas

temperaturas de fritura levam a uma maior perda de água mas por outro lado diminui a quantidade de óleo absorvido. A influência que o óleo exerce na quantidade que é absorvida não é tanto pelo tipo de óleo mas sim pela qualidade deste. Um óleo com baixa qualidade possui um maior número de compostos de degradação diminuindo a polaridade e a viscosidade do meio facilitando a absorção de óleo **(30, 36, 37)**.

### **1.2.2. Reações químicas**

As reações químicas entre os óleos de fritar e os constituintes dos alimentos são muito importantes para o desenvolvimento de propriedades sensoriais típicas dos alimentos fritos, como o odor, a cor e o sabor. Várias reações químicas ocorrem no óleo durante o processo de fritura, tais como a hidrólise, a oxidação e as alterações térmicas, que levam à formação de produtos indesejáveis com diferentes polaridades, estabilidades e peso molecular **(38, 39)**. O tipo de reação química que ocorre e a natureza dos produtos químicos são controlados por fatores como o tipo fritadeira usada, o rácio óleo-massa de alimento e a disponibilidade de oxigénio **(9)**.

#### **1.2.2.1. Hidrólise**

A hidrólise é um processo bem conhecido que ocorre em óleos e gorduras e é iniciado pela presença de água, vapor e oxigénio e onde podem intervir enzimas lipolíticas. O processo de fritura é realizado a elevadas temperaturas e durante esse processo a humidade forma vapor que evapora gradualmente. A água, que é um nucleófilo fraco, ataca na ligação éster dos TG originando di- e monoacilgliceróis, glicerol e AG livres (AGL). Esta reação é muito importante no processo de fritura pois todos os alimentos têm uma elevada percentagem de humidade e porque esta é a única que leva à formação de AGL e de diacilgliceróis **(1, 30)**. O conteúdo de AGL aumenta com o número de frituras o que não é desejável pois estes diminuem o ponto de fumo, formam compostos voláteis e conferem sabor desagradável aos alimentos **(40)**.

#### **1.2.2.2. Oxidação**

A oxidação de lípidos durante o processo de fritura é complexa pois são envolvidas simultaneamente reações oxidativas e térmicas. A reação de oxidação ocorre quando o oxigénio interage com o óleo de fritar **(30, 41)**. A figura 3 ilustra o processo de oxidação térmica que ocorre em cadeia. O passo de iniciação envolve a formação de um radical livre através da remoção de um átomo de H a uma molécula de TG, na figura 3 representada como RH. Diferentes condições podem facilitar a formação de radicais livres, tais como o calor, luz, metais e espécies reativas de oxigénio **(1, 30)**.

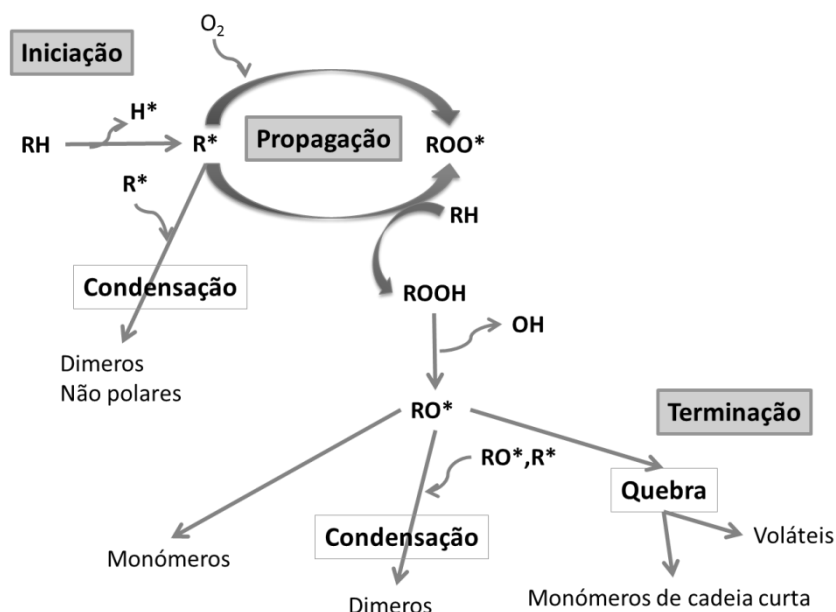


Figura 3 Esquema do mecanismo de oxidação térmica (30).

Ao longo deste processo são constantemente formados compostos poliméricos. A formação de compostos de oxidação é muito regulada pela temperatura a que a fritura ocorre. Estas diferentes temperaturas levam à decomposição dos TG em produtos de diferentes polaridades, estabilidade e peso molecular (30).

A degradação oxidativa não é sempre igual para os diferentes óleos e gorduras usadas, pois cada um destes possui diferentes composições de AG. As ligações químicas entre átomos de H e de C variam entre os diferentes AG originando diferentes taxas de oxidação. Também a quantidade de compostos voláteis formados é variável sendo dependente do tipo de óleo, alimento e condições de fritura (1). A oxidação dos óleos é regulada pela presença de antioxidantes no óleo, como esteróis e tocoferóis, no entanto o funcionamento destes é dependente da temperatura e do grau de insaturação dos AG do óleo (42, 43).

### 1.2.2.3. Reações térmicas

Durante o processo de fritura podem também ocorrer reações térmicas, sem a intervenção de oxigénio, dando origem a moléculas com baixa polaridade. Esta reação ocorre quando a elevadas temperaturas começa a haver pouca disponibilidade de oxigénio, devido à elevada tensão na interface óleo/ar criada pela presença de vapor (44). Assim, diversas moléculas de degradação são formadas como os dímeros de TG não polares e isómeros de TG, que podem ser cíclicos ou AG *trans*. A formação de dímeros TG não polares ainda é pouco compreendida pois apenas alguns estudos foram realizados e em condições que não imitam o processo de fritura (30).

Os processos de pré-tratamento dos óleos vegetais levam a uma mudança na composição destes, sendo que a refinação diminui a presença de isómeros de TG e a hidrogenação aumenta a presença de AG *trans*. Romero e os seus colaboradores (2000) verificaram que existem muitos alimentos que são pré-fritos em óleos hidrogenados, podendo assim contaminar o óleo de fritar através da migração de compostos, como AG *trans* (45). No entanto, ainda pouco estudos foram realizados para averiguar a formação de AG *trans* durante o processo de fritura. Alguns estudos realizados verificaram que quando não são usados óleos hidrogenados durante a fritura a percentagem de AG *trans* presentes é muito baixa indicando que AG *trans* são inseridos inicialmente no meio e não são formados como consequência da fritura (46-48).

A formação de AG cíclicos deriva principalmente de ácidos linoleicos e de ácidos  $\alpha$  – linolénicos quando estes são expostos a elevadas temperaturas. Estudos indicam que estes compostos são prejudiciais para a saúde, no entanto a presença destes em óleos ocorre normalmente em percentagens muito reduzidas. O facto dos AG cíclicos poderem ser prejudiciais para a saúde intensificou a investigação destes, originando um estudo detalhado da estrutura destes (49).

Todas estas reacções químicas levam à formação de compostos indesejáveis. Vários estudos já indicaram que os alimentos absorvem uma percentagem de óleo durante a fritura, sendo por isso importante controlar a qualidade do óleo (35, 50). Os principais produtos de decomposição originados durante o processo de fritura são os compostos polares totais (CPT), não voláteis, e os polímeros. Como estão presentes em maior percentagem em óleos de fritar usados, estes são os compostos mais usados e aceites como parâmetros para monitorizar a qualidade do óleo de fritar (7, 51, 52).

### 1.3. Efeitos do óleo e gordura de fritar na saúde

O entendimento de quais os nutrientes de maior importância para o corpo humano é um facto importante para a manutenção da saúde humana. O conhecimento de quais os nutrientes essenciais e qual a quantidade necessária para o correto funcionamento do corpo humano é fundamental para controlar e diminuir a incidência de doenças (17).

A ingestão de alimentos fritos resulta, maioritariamente, na entrada de gorduras na forma de AG no organismo humano. A quantidade de AG que são ingeridos na dieta altera a concentração de lipoproteínas com funções importantes na corrente sanguínea. Na tabela III encontram-se as quantidades diárias recomendáveis de gorduras que podem ser consumidas, porém estas são apenas recomendações sendo dependentes da idade, peso e atividade física do consumidor (53, 54).

**Tabela III** Recomendações da quantidade diária ingerida de calorias, gorduras e AG saturados para adultos e crianças **(17)**.

|                             | Calorias (kcal) | Gorduras (g) | AG saturados (g) |
|-----------------------------|-----------------|--------------|------------------|
| <b>Mulheres</b>             | 2000            | 70           | 20               |
| <b>Homens</b>               | 2500            | 95           | 30               |
| <b>Crianças (7-10 anos)</b> | 1800            | 70           | 20               |

### 1.3.1. Função dos AG no corpo humano

Os AG que incorporam a dieta são uma das principais fontes de energia para as células do corpo humano, correspondendo a 40% da energia necessária diariamente. Os TG são usados como fonte de energia no corpo humano, em detrimento de polissacarídeos, pois estes produzem o dobro da energia e são mais fáceis de transportar e armazenar. Estes intervêm em diversos ciclos metabólicos fundamentais para obtenção de energia, na manutenção da membrana celular e na formação de diversos compostos importantes **(10)**.

Quando os TG entram no corpo humano, através da alimentação, antes de poderem ser digeridos no intestino delgado, estes têm de ser solubilizados através da ligação a sais biliares. Esta solubilização permite a sua digestão por lípases que convertem os TG em di- e monoglicerídeos, AG livres e glicerol. Estes produtos são absorvidos pelas células epiteliais onde são reconvertidos em TG e ligados a moléculas de colesterol e a proteínas específicas formando lipoproteínas, que são responsáveis pelo transporte de TG entre órgãos através do sangue. A combinação entre as diferentes moléculas de TG e as restantes moléculas gera lipoproteínas de diferentes densidades, variando entre as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de elevada densidade (HDL) **(10)**.

As VLDLs são formadas quando são ingeridos mais AG do que os que são necessários para converter em energia, assim o fígado converte os AG em TG e depois forma as VLDLs que fluem no sangue para os tecidos adiposos. Nestes são removidos TG das VLDLs, que são armazenados em gotículas de gorduras, resultando em VLDLs com densidade diferente chamadas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estas são ricas em colesterol e ésteres de colesteril, e fazem o transporte destas moléculas para tecidos extra-hepáticos e podem provocar a obstrução dos vasos sanguíneos. As HDL são formadas no fígado e no intestino delgado, e são lipoproteínas ricas em proteínas e com baixa quantidade de colesterol e sem ésteres de colesteril. Estas interatuam com restos de lipoproteínas que estejam no sangue adquirindo o colesterol dessas. As HDL enriquecidas com colesterol regressam ao fígado onde libertam o colesterol que é posteriormente reconvertido em sais biliares, diminuindo assim a presença de colesterol na corrente sanguínea. O desequilíbrio entre as HDL e LDL no sangue, sendo aconselhável elevados níveis de HDL e baixos níveis de LDL, está relacionado com a

ocorrência de enfartes, acidentes vasculares cerebrais (AVC), entre outras doenças cardíacas e não só **(10, 17)**.

Para além de fundamentais na aquisição de energia e no transporte de moléculas importantes, os AG intervêm também na manutenção da estrutura da membrana celular e são precursores de eicosanóides **(10)**. A membrana celular é composta por diferentes lípidos em que da sua composição fazem parte os AG, sendo estes importantes precursores dos lípidos de membrana. Os eicosanóides são hormonas parácrinas derivadas de AG, e têm importantes funções em processos inflamatórios, na formação de coágulos no sangue, secreções de ácido gástrico, no sistema reprodutivo entre outros processos muito importantes para a saúde humana. Estes são muito importantes na prevenção contra problemas cardíacos pois estão envolvidos na produção de prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos e imunoglobulinas, que, entre outras coisas, induzem a constrição dos vasos sanguíneos **(55)**.

### **1.3.2. Problemas de saúde causados pelo processo de fritura**

A dieta alimentar possui um papel muito importante para a saúde dos consumidores, sendo que o risco de muitas doenças crónicas está relacionado com a dieta e pode baixar significativamente com um melhoramento da dieta. Os produtos fritos são bastante apelativos para os consumidores, no entanto é necessário compreender que estes podem prejudicar a saúde humana, quer pelo seu consumo quer durante a sua produção. A principal preocupação na ingestão de alimentos fritos é o consumo inadequado de grandes quantidades de calorias, colesterol e de gorduras saturadas que levam ao crescimento de uma população obesa. No entanto, o consumo em excesso de alimentos fritos também causa outros problemas de saúde muito graves como doenças cardiovasculares (DCV), cancro, diabetes, hipertensão e aterosclerose, entre outros **(13, 37)**.

As DCV estão normalmente associadas a dietas ricas em colesterol e gordura saturada. Como forma de proporcionar uma dieta mais saudável foi aconselhado a troca de gorduras animais por gorduras vegetais, aumentando também o consumo de AG essenciais, ómega-3 e ómega-6. O consumo destes óleos essenciais pode ser vantajoso, pois os AG ómega-3 estão relacionados com a redução de doenças inflamatórias, DCV e alguns cancros. No entanto, o consumo elevado de AG ómega-6 e um consumo deficiente em ómega-3 pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crónicas e cancros **(13)**.

A hipertensão é um problema de saúde causado pelo aumento da pressão arterial, que é comum em países desenvolvidos, este leva a complicações cardiovasculares e cerebrovasculares assim como doenças renais **(56)**. A relação entre a ocorrência de hipertensão e o consumo de gordura ainda é um pouco controversa, sendo que alguns estudos

indicam uma relação direta entre estes enquanto outros não **(57)**. Soriguer e os seus colaboradores (2003) realizaram um estudo cujo principal objetivo era relacionar a degradação dos óleos de fritar com a incidência de hipertensão. Como conclusão ele retirou que o risco de hipertensão é positiva e independentemente relacionado com o consumo de produtos que resultem de óleos de fritar degradados **(57)**. Yen e os seus colaboradores (2010) levaram a cabo uma experiência para apurar os efeitos do óleo de fritar no stress oxidativo e na pressão sanguínea em ratos espontaneamente hipertensos e ratos controlo. Dessa experiência concluiu-se que uma dieta rica em óleo degradado não influencia a pressão sanguínea mas o metabolismo de eicosanóides, tanto para os ratos controlo como para os ratos espontaneamente hipertensos **(58)**.

Os óleos de fritar, devido à exposição a elevadas temperaturas, formam lípidos oxidados que são transferidos para os alimentos. A ingestão destes provoca um aumento dos níveis de LDL no sangue ricos em lípidos oxidados, que estão relacionados com o aparecimento da aterosclerose, uma doença inflamatória **(13, 59)**. Diferentes AG influenciam de diferente maneira os níveis de LDL e HDL, sendo importante uma alimentação equilibrada de modo a manter os níveis de LDL baixos e os de HDL elevados. Os óleos de fritar são uma boa fonte de ómega 3 e 6 que mantêm os níveis de LDL baixos e os de HDL elevados. No entanto, a composição dos óleos vegetais pode variar, visto que nem todos são iguais **(10, 17, 55)**.

Não só a ingestão de alimentos fritos pode prejudicar a saúde humana. Durante o processo de fritura diversos compostos voláteis são formados que podem prejudicar a saúde, apresentando propriedades carcinogénicas, mutagénicas e genotóxicas **(60-62)**. A ocorrência de doenças devido à exposição aos fumos do óleo de fritar é mais frequente nos países asiáticos, como a China, Hong Kong e Tailândia, no entanto também já foram encontrados casos na Europa. A exposição prolongada a fumos derivados do óleo de fritar está relacionada com a ocorrência do adenocarcinoma no pulmão assim como outras doenças cardíacas, principalmente em mulheres **(63-65)**. Os fumos libertados durante a fritura são uma mistura complexa de AG polinsaturados degradados que formam aldeídos, sendo o mais abundante e citotóxico o trans,trans-2,4-decadienal. Estudos demonstraram que este aldeído tem propriedades altamente carcinogénicas, sendo responsável pelo aumento do *stress* oxidativo e da proliferação celular em células dos pulmões **(66, 67)**.

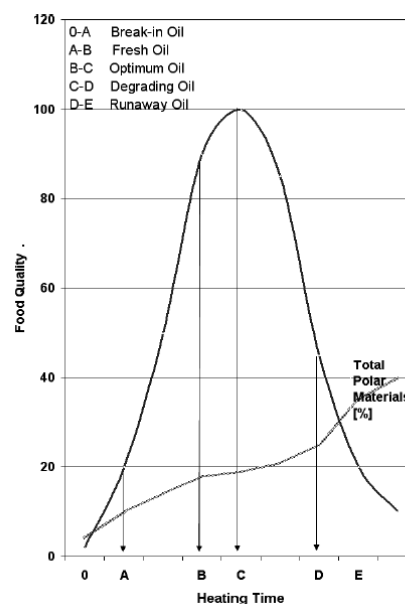
#### **1.4. Controlo de qualidade do processo de fritura**

A qualidade de um alimento é o somatório de várias características: as organoléticas, a estabilidade, o valor nutricional, a segurança alimentar e a autenticidade **(68)**. Durante o processo de fritura o alimento é sujeito a diversas mudanças e reações químicas que irão

modificar a qualidade dos óleos e gorduras usadas para fritar atingindo o ponto em que já não são produzidos alimentos com qualidade. Assim, a questão que necessita ser respondida é: *quando deve o óleo de fritura ser trocado?* A complexidade de todo o processo de fritura não permite uma resposta direta e simples pois existem diversas variáveis a serem consideradas que alteraram o comportamento do óleo.

O controlo de qualidade do processo de fritura está intrinsecamente dependente da qualidade do óleo de fritar. A qualidade de um óleo vegetal depende em muito da qualidade da matéria-prima que lhe deu origem, assim como da sua estabilidade durante o processo de fritura (68). As altas temperaturas necessárias para o processo de fritura levam à formação de compostos voláteis e não voláteis que afetam a estabilidade do óleo e levam á deterioração do alimento. Estas alterações levam à diminuição da qualidade do sabor e do valor nutricional, entre outros (6, 69).

Ao longo do processo de fritura existem diferentes etapas que são visíveis na figura 4. Nas primeiras etapas do processo de fritura o óleo apresenta boa qualidade produzindo alimentos com as características adequadas. Esta fase, chamada de fritura ótima, pode ser prolongada com a troca constante do óleo de fritar. No entanto, deixando o óleo exposto a temperaturas elevadas durante longos períodos, este começa a degradar-se, e uma vez iniciada, a degradação é irreversível. Começando o óleo a degradar-se, o processo de fritura não é mais viável começando a produzir alimentos sem qualidade (70).



**Figura 4** Esquema da variação da qualidade do óleo com o tempo de aquecimento (70)

#### 1.4.1. Fatores que afetam a qualidade

Existem diferentes fatores que afetam a cinética da deterioração do óleo de fritar, tais como a temperatura e a duração do processo de fritura, o tipo de alimento, o tipo de fritadeira, a composição do óleo de fritar, entre outros.

Em geral, as elevadas temperaturas e o período de tempo prolongado do processo de fritura aumenta a formação de compostos indesejáveis. No entanto, as temperaturas elevadas podem ter efeitos contrários nos compostos formados, pois pode diminuir a formação de compostos com ligações de peróxido e aumentar a formação de compostos com ligações éster (71). A fritura pode também ser realizada de forma descontínua havendo uma maior deterioração do óleo, pois durante a fase de arrefecimento o oxigénio pode solubilizar (72).



A composição dos óleos de fritar tem grande influência na qualidade do processo de fritura, pois a presença de AGL e AG insaturados aumenta a oxidação térmica. A presença do ácido linoleico é crítico para a estabilidade do óleo e para o sabor dos alimentos, sendo que uma baixa percentagem deste produz menos AG livres e menos compostos polares **(73)**. Durante a produção dos óleos de fritar estes podem ser sujeitos a diversos processos que alteram a composição do óleo. A hidrogenação e a modificação genética são dois processos que melhoram a qualidade do óleo diminuindo a quantidade de AG insaturados e dessa forma aumentado a estabilidade do óleo. No entanto, estudos demonstraram que o processo de hidrogenação aumenta o número de AG *trans* **(74)**. A modificação genética dos óleos de fritar pode ser usada para aumentar a quantidade de ácido oleico e diminuir a quantidade de ácido linoleico aumentando a estabilidade do óleo **(75)**.

Existem diversos compostos que protegem os óleos de fritar contra a oxidação, como por exemplo o tocoferol. No entanto, a proteção realizada por parte destes compostos está dependente da temperatura, pois a temperaturas elevadas estes podem volatilizar ou decompor. É a composição em antioxidantes que torna cada óleo característico, com diferente resistência á temperatura e diferente cinética de degradação **(1)**.

A qualidade do processo de fritura está dependente da composição dos alimentos que vão ser sujeitos ao processo. A humidade dos alimentos é um fator que intensifica o processo de hidrólise influenciando assim a qualidade do processo **(76)**. Diversos compostos presentes nos alimentos aumentam a oxidação, como lecitina ou metais de transição. Alguns alimentos são pré tratados antes de serem fritos para consumo, podendo ser cobertos com pão ou com massa ou mesmo pré-fritos. Estas modificações fazem com que durante o processo de fritura se libertem compostos para o meio de fritura que vão comprometer a qualidade do processo de fritura **(77)**.

O processo de fritura é altamente influenciado pela temperatura, pelo modo de transferência de calor e pela sua homogeneização, e isso é controlado pelo tipo de fritadeira que é utilizada. Um aquecimento homogéneo previne a formação de pontos quentes que queimam o óleo. A gordura polimerizada pode depositar-se na fritadeira e levar á formação de espuma, ao escurecimento do alimento e à posterior deterioração do óleo. A estrutura da fritadeira é também muito importante sendo aconselhável que haja um pequeno rácio superfície-volume, para minimizar o contacto com o ar, e não é aconselhável que esta seja composta por ferro ou cobre pois estes aumentam a oxidação do óleo de fritar **(78)**.

Assim para que a qualidade do processo de fritura seja assegurado é necessário controlar os seguintes critérios: o desenho, manutenção, utilização e limpeza adequada do equipamento; monitorização de pelo menos um indicador de degradação; minimizar

exposição a luz UV (ultravioleta); evitar utilização de sal e outras fontes de metais; filtrar regularmente o óleo **(79)**.

#### **1.4.2. Indicadores de qualidade**

O controlo de qualidade do óleo usado para fritar pode ser realizado através da determinação de diversos indicadores, químicos ou físicos. Por vezes a avaliação de qualidade mais importante é a avaliação sensorial, no entanto nem sempre é prática e não fornece dados quantitativos. A determinação de quando deve o processo de fritura ser interrompido é um problema complexo, devido à dificuldade em escolher um indicador que forneça resultados confiáveis em todas as situações **(31, 69)**.

##### **1.4.2.1. Indicadores físicos**

Ao longo da fritura diversas mudanças ocorrem em parâmetros físicos que podem ser utilizados para controlar a degradação do óleo. Existem alguns métodos que são utilizados para quantificar as modificações físicas que ocorrem de modo a avaliar a qualidade do óleo, tais como a densidade, viscosidade, formação de espuma, ponto de fumo, cor, índice de refração, absorção UV, espectroscopia IV (infravermelha) e a constante dielétrica **(51)**.

A formação de compostos de degradação leva a mudanças físicas como a formação de espuma, correlacionado com a presença de polímeros, e a formação de fumo, correlacionado com a presença de AGL **(80)**. A espuma não é muito usual em processos contínuos, no entanto nos processos descontínuos pode se tornar num verdadeiro problema. Existem operadores que usam este indicador para descartar o óleo, relacionando a altura da espuma com a degradação do óleo.

A avaliação direta da cor do óleo é um indicador físico fácil de usar, no entanto pode ser enganador pois os diferentes óleos podem escurecer de formas diferentes representando diferentes cinéticas de degradação **(51)**. A utilização deste indicador sobrepõe-se à utilização do odor ou do sabor pois este desenvolve-se primeiro e torna-se inaceitável mais rapidamente. Xu (2003) desenvolveu um método colorimétrico que mede o índice de cor do óleo e relacionou com a percentagem de CPT verificando que existe uma boa correlação entre estes **(81)**. Outro método que também pode ser usado para a determinação da degradação do óleo com recurso à cor é a espectroscopia de absorvância de UV e visível **(82)**. Estes primeiros indicadores referidos, apesar de simples e de fácil utilização, não são fiáveis pois produzem resultados subjetivos, que dependem da avaliação do utilizador.

A determinação da constante dielétrica é um indicador de qualidade do óleo amplamente utilizado. Com a deterioração do óleo ao longo da fritura há um aumento da quantidade de compostos polares que aumentam a constante dielétrica **(83)**. El-Shami e os seus

colaboradores (1992) compararam os resultados de propriedades dielétricas com os de outros métodos convencionais, como a viscosidade, o índice refrativo, os AGL, entre outros, demonstrando que as propriedades dielétricas podem ser mais vantajosas para a análise da qualidade de óleos de fritar **(84)**. A viscosidade determina as propriedades viscosas de um fluido a determinada temperatura e pressão, nas condições de fritura há um aumento de compostos poliméricos que aumentam a viscosidade e a densidade do óleo **(2, 42)**. No entanto, a viscosidade não é só dependente do processo de fritura mas também do óleo que é usado sendo que a composição deste influencia a evolução da viscosidade. Estes dois indicadores, apesar de continuarem a apresentar problemas, são mais adequados na medida em que tiram subjetividade na avaliação do óleo.

#### ***1.4.2.2. Indicadores químicos***

O processo de fritura provoca alterações químicas no óleo de fritar, modificando compostos existentes ou formando compostos novos. Assim, a monitorização de compostos como AGL, monómeros de AG não oxidados, TG polimerizados, CPT, de valores de iodo, de anisidina, de saponificação, permitem avaliar a qualidade do óleo de fritar **(51)**.

Os AGL aumentam durante o processo de fritura através de reações químicas, como a hidrólise, e são indesejáveis quando voláteis pois produzem sabores e aromas desagradáveis, sobretudo quando estes são de baixo peso molecular. A quantidade de AGL presente no óleo de fritar altera a acidez deste que pode facilmente ser monitorizada por processos colorimétricos. No entanto, a utilização da acidez do óleo como indicador de qualidade não é aconselhável por apenas representar uma medição indireta de compostos polares **(85, 86)**. Assim, para um controlo mais fiável é preferível usar como parâmetros os CPT e os TG polimerizados **(2, 51)**.

Os CPT são os diversos compostos de degradação originados durante o processo de fritura que Blumenthal definiu como sendo a soma de todos os materiais que não sejam os TG originais, como os polímeros de TG, dímeros de TG, TG oxidados, entre outros **(87)**. A presença destes compostos leva a diversas alterações do óleo, quer físicas, como alteração da cor e da viscosidade, quer químicas, sendo por isso um critério fiável para avaliar a qualidade do processo de fritura **(2, 88)**. A determinação de CPT fornece uma medição direta da degradação que ocorre durante o processo de fritura, sendo independente do tipo de óleo usado pois os valores de CPT em óleos não usados são muito similares **(89)**.

Na fração polar são encontrados maioritariamente compostos poliméricos, como dímeros e oligómeros, que com a degradação aumentam em maior proporção que os restantes compostos. Os polímeros são compostos complexos sendo resultado da oxidação de diferentes

AG insaturados de diferentes TG e das diferentes moléculas de TG que são formadas, como dímeros e oligómeros. Durante o processo de fritura os polímeros usualmente formados são dímeros e trímeros ligados por ligações C-C e C-O-C **(90, 91)**. A determinação apenas dos compostos poliméricos formados durante a fritura é atrativa, pois para além de existir uma boa correlação entre estes e a quantidade de CPT a sua quantificação é também mais fácil, demorando entre 10 e 15 minutos, e é realizada por uma cromatografia de elevada performance de exclusão molecular **(7)**.

### **1.4.3. Determinação da qualidade dos óleos e gorduras de fritar – Testes Rápidos**

Assegurar a qualidade do óleo de fritar utilizado na preparação de alimentos é um fator muito importante para as empresas cuja principal fonte de rendimento vem da comercialização desse tipo de alimentos. As empresas de alimentos pré-fritos necessitam de métodos bem implementados, fáceis de usar e baratos que permitam o controlo da qualidade dos óleos de fritar utilizados. Neste tipo de indústrias, a implementação de testes rápidos é mais fácil, sendo os resultados mais rigorosos, pois as condições de fritura são bem controladas e constantes. Mas os restaurantes e locais de venda imediata necessitam de métodos mais robustos, que permitam comprovar rapidamente e de forma rigorosa a qualidade do óleo, independentemente das condições de utilização. Estes testes rápidos assumem também um papel importante na investigação, nomeadamente no desenvolvimento de novos óleos, em que as quantidades podem ser limitadas e resultados rápidos são mais adequados, e na avaliação da performance de processos de fritura **(9)**.

Muitas empresas utilizam métodos mais subjetivos para avaliar a qualidade do óleo de fritar, como a formação de espuma ou a mudança de cor, devido à sua facilidade de execução. No entanto, estes métodos não são fiáveis devido à subjetividade a eles associada não sendo suficientes para caracterizar o óleo como inadequado para uso **(92)**. Assim, de forma a responder às necessidades do mercado tornou-se essencial o desenvolvimento de metodologias rápidas, fiáveis e baratas, os chamados testes rápidos. Em 2000, a Sociedade Alemã de Investigação de Gordura **(93)** determinou quais deveriam ser as características de um teste rápido, que estão enumeradas na tabela IV, de modo a que a utilização deste possa ser aceite na comunidade científica e recomendável para a utilização rotineira na comunidade empresarial **(52)**.

**Tabela IV** Requisitos de um teste rápido adequado (2, 51, 79).

| Requisitos de um teste rápido adequado   |
|--|
| Ser correlacionável com um método de referência reconhecido internacionalmente |
| Produzir um resultado objetivo   |
| Fácil de usar  |
| Seguro de usar durante a preparação dos alimentos (não tóxico)                 |
| Quantificar a degradação do óleo de fritar                                     |
| Ser robusto  |
| Permitir um controlo rotineiro   |
| Ser amigo do ambiente  |
| Ser independente da natureza do óleo de fritar                                 |
| Não influenciar a preparação dos alimentos                                     |

Tendo em conta o impacto que os testes rápidos têm nas empresas alimentares, é importante certificar que estes produzem resultados fiáveis e reprodutíveis, sendo capazes de substituir os métodos oficiais. A validação de testes rápidos implica a comparação direta entre os resultados que estes produzem e os resultados reproduzidos pelos métodos oficiais. Os testes só são fiáveis quando existe uma boa correlação entre os resultados deste e os do método oficial, no entanto, podem esporadicamente ocorrer resultados falsos. Existem dois tipos de resultados falsos: a) falso positivo, em que o teste rápido indica que o óleo deve ser descartado apesar do método oficial indicar uma percentagem CPT inferior ao limite legal; b) falso negativo, em que o teste rápido indica que o óleo pode ser reutilizado apesar do método oficial indicar uma percentagem de CPT superior ao limite legal (8). Dependendo da perspetiva do utilizador, alguns resultados podem ser mais prejudiciais do que outros. Testes rápidos com demasiados falsos negativos são prejudiciais por levarem à utilização de óleos com valores de CPT prejudiciais para a saúde humana e em muitos casos ilegais. Por outro lado, testes com demasiados falsos positivos levam a que haja um descarte de óleos quando não é necessário levando a despesas desnecessárias.

#### **1.4.3.1. OleoTest® vs. o método oficial para a determinação de CPT**

A utilização do parâmetro CPT é o mais aceite para a determinação da qualidade de óleos de fritar, pois é o que engloba o maior número de compostos formados durante a fritura originando um controlo mais fiável. A determinação de CPT em gorduras e óleos animais e vegetais é normalmente realizada usando o método ISO 8420:2002, *Animal and Vegetable fats and oils - Determination of content of polar compounds*. Este método consiste na separação dos compostos polares e não polares, usando uma coluna de adsorção de sílica gel. A utilização do eluente adequado permite a eluição dos compostos não polares e a posterior

determinação, por diferença, dos compostos polares **(94)**. Este método é bem aceite na comunidade científica pois permite uma determinação rigorosa da percentagem de CPT. No entanto, este método é lento, caro e extremamente sensível a variações de temperatura e de fluxo, o que torna a sua implementação muito difícil. Tudo isto associado ao facto de necessitar de uma pessoa especializada para a sua utilização, de espaço e de equipamento específico inviabiliza a sua utilização rotineira nas superfícies que mais necessitam, como restaurante e cadeias de *fast-food* **(7, 95)**. A crescente procura de métodos que determinem a qualidade dos óleos de fritar que cumpram os requisitos pré-estabelecidos (tabela IV) despertou o interesse de vários investigadores. A Castro, Pinto & Costa, Lda. (CPC) lançou, em 2002, o OleoTest® (OT) que permite o controlo de qualidade de óleos alimentares usados na fritura.

O OT consiste numa mistura de reagentes químicos que reagem com os CPT das amostras de óleos de fritar produzindo uma variação da resposta de cor. Este teste é rápido, fácil e seguro de usar, para além de ser capaz de quantificar a degradação do óleo de forma correlacionável com o método de referência para a quantificação de compostos polares (ISO 8420:2002). O problema mais significativo do OT é o facto de não originar uma resposta objetiva, isto porque a cor resultante do teste tem de ser avaliada em comparação com uma tabela de cores pelo operador. Para além disso, a sua resposta é dependente do óleo de fritura, sendo que um óleo com uma cor muito intensa pode enviesar o resultado do OT, como é o caso do óleo de palma **(96)**.

Este teste já é muito divulgado, sendo comercializado internacionalmente e utilizado por entidades oficiais, como a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). A utilização deste em ações de fiscalização é atrativa pois os resultados dos testes podem se manter inalterados durante longos períodos de tempo, quando as condições de armazenamento são adequadas, o que permite a sua utilização como prova legal.

As empresas do ramo alimentar devem aplicar um ou vários processos permanentes baseados nos princípios de análise de perigos e controlo de pontos críticos, segundo especificação do regulamento (CE) n.º 852/2004 **(97)**. O sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) é um sistema preventivo que consiste na identificação de perigos e da probabilidade da sua ocorrência em todas as etapas da produção de alimentos, definindo medidas para o seu controlo **(98)**. Desta forma, o OT constitui uma importante ferramenta nos sistemas HACCP e de segurança alimentar das empresas do ramo alimentar permitindo o controlo de qualidade na produção de produtos fritos.

Como já referido, a percentagem de CPT das amostras de óleos é indicada pelo OT através da mudança de cor do teste. Na tabela V estão identificadas as respostas que o OT pode

apresentar e o seu significado. O OT tornou-se rapidamente um teste rápido muito importante no mercado atual e mais importante ainda para a sustentabilidade da empresa que o desenvolveu. Por isso, é assegurado o contínuo estudo para melhorar a sua performance, a sua fiabilidade e produtividade.

**Tabela V** Resposta apresentada pelo OT mediante a percentagem de CPT presente na amostra.

| CPT (%) | Nível do OT |
|---------|-------------|
| < 5     | 1           |
| 6 -12   | 2           |
| 13 - 16 | 3           |
| 17 - 23 | 4           |
| > 24    | 5           |

A aplicação de qualquer um destes métodos para a análise de CPT em óleos de fritar está dependente da correta validação destes, de modo a demonstrar a fiabilidade dos resultados obtidos. O processo de validação de um método consiste em aferir se este é adequado para o uso pretendido estabelecendo os parâmetros de desempenho, como a reprodutibilidade, exatidão, robustez, gama de trabalho, entre outros, e também através da especificação de requisitos, limitações e características do método. A necessidade de validar um método vem da crescente procura de dados analíticos comparáveis e consistentes, sendo esta necessidade destacada pelos sistemas de qualidade.

Para a correta caracterização de muitos dos parâmetros de desempenho é necessário usar amostras padrão, neste caso, amostras homogéneas e estáveis que imitem a matriz do óleo de fritar e que possuam uma concentração de CPT conhecida e controlada. No entanto, a produção destas amostras não está aperfeiçoada nem é muito estudada. Na CPC tentaram misturar amostras de óleo usado, devidamente quantificado, com óleo virgem no entanto este processo não foi bem-sucedido pois a diminuição de compostos polares não era linear com a diluição efetuada (99). Uma outra abordagem aconselhada por Dorbarganes é fazer uma *pool* de compostos polares extraídos de amostras, no entanto, esta abordagem é morosa e difícil por requer a análise de milhares de amostras (100). Por outro lado, a monoesterina, um éster glicerol do ácido esteárico, já foi usada como padrão interno para avaliar o desempenho de dois métodos de determinação de CPT (100). Esta poderia ser uma abordagem interessante, permitindo produzir amostras padrão para poderem ser usadas para avaliar o desempenho do método ISO e também do OT.

#### **1.4.3.2. Outros testes rápidos**

Existem muitos testes rápidos para determinar a qualidade do óleo de fritar, no entanto estes diferenciam-se entre si principalmente na fiabilidade dos resultados originados e no parâmetro utilizado para avaliação da qualidade.

Muitos testes rápidos são desenvolvidos de forma a detetar a quantidade de AGL devido à elevada correlação existente entre AGL e CPT em sistemas constantes, com o mesmo óleo e alimento **(51)**. Um teste rápido desenvolvido com base neste princípio é o *3M shortening monitor* que consiste numa tira que fornece uma resposta com cor baseada na percentagem de AGL presentes na amostra em contacto. No entanto, vários investigadores condenam a utilização de AGL como parâmetro pois não encontram nenhuma relação entre o valor de acidez e a qualidade do óleo de fritar **(51)**.

Um outro parâmetro que é amplamente utilizado é a determinação da constante dielétrica, que pode ser correlacionada com a qualidade do óleo de fritar pois o aumento da constante dielétrica é proporcional ao aumento dos compostos polares. No entanto, este método não é normalmente robusto pois a variação de temperatura altera os resultados, parâmetro que está em constante alteração durante o processo de fritura.

Na tabela VI estão representados alguns dos testes rápidos mais divulgados assim como algumas das suas características mais relevantes.



**Tabela VI** Quadro resumo de alguns testes rápidos disponíveis no mercado **(2, 73, 101)**

| Teste rápido         | Parâmetro              | Método de Funcionamento   | Vantagens   | Desvantagens  |
|----------------------|------------------------|---|---|---|
| <b>OleoTest®</b>     | CPT                    | Mistura reacional num tubo reage com amostra e origina uma cor específica | Rápido<br>Fácil<br>Validade de 18 meses<br>Seguro<br>Estável                            | Subjetivo<br>Não dá um valor absoluto   |
| <b>3M</b>            | AGL                    | Tira muda de cor quando em contacto com amostra                           | Rápido<br>Fácil<br>Não necessita de químicos  | Subjetivo<br>Não determina CPT ou polímeros<br>Armazenado a baixas temperaturas<br>Contacto direto com o óleo<br>Não dá um valor absoluto                           |
| <b>Testo 265</b>     | Constante dielétrica   | Inserção do aparelho no óleo, resultado no monitor                        | Rápido<br>Fácil<br>Não necessita de calibração  | Influenciado pela humidade<br>Elevado custo<br>Contacto direto com o óleo   |
| <b>TPM Very Fry®</b> | CPT                    | Mistura reacional num tubo reage com amostra e origina uma cor específica | Rápido<br>Fácil<br>Seguro<br><i>Ecológico</i><br>Barato                                 | Subjetivo<br>Necessário espectrofotometro para objetividade<br>Necessária curva de calibração   |
| <b>Oxifri Test®</b>  | AG oxidados            | Determinação colorimétrica por passos                                     | Rápido<br>Barato<br>Correlação moderada com % CPT<br>Boa medida de degradação oxidativa | Subjetivo<br>Necessário misturar reagentes<br>Não determina CPT ou polímeros<br>Usa reagentes perigosos   |
| <b>Fritest®</b>      | Compostos carbonilicos | Determinação colorimétrica por passos                                     | Rápido<br>Barato<br>Correlação moderada com % CPT                                       | Subjetivo<br>Necessário misturar reagentes<br>Não determina CPT ou polímeros<br>Usa reagentes perigosos   |
| <b>FASafe®</b>       | AGL                    | Determinação colorimétrica por passos                                     | Rápido<br>Correlação moderada com % CPT   | Subjetivo<br>Necessário misturar reagentes<br>Necessário espectrofotometro<br>Necessária curva de calibração<br>Baixa performance<br>Não determina CPT ou polímeros |

#### 1.4.4. Legislação

A utilização de óleos repetidas vezes levanta alguns problemas de segurança em relação à saúde humana. Em 2000, a sociedade alemã de investigação de gordura organizou um simpósio muito importante, em que ainda hoje se seguem as diretrizes discutidas e definidas nele **(52)**. Neste simpósio foi definido que o óleo de fritar deveria ser descartado quando apresentasse percentagens de compostos polares superiores a 27% determinadas a partir de uma análise cromatográfica. Assim, a legislação de muitos países usa esta recomendação, com algumas alterações, para regulamentar o controlo de qualidade do óleo.

Desse modo, existem diversos países atentos a este problema que criaram legislação para o controlo de qualidade do óleo de fritar, outros deixam a cargo do sector privado fazer o controlo de qualidade do óleo de fritar sem impor nenhuma legislação apenas divulgando recomendações de boas práticas **(102, 103)**. No entanto, existem também países que não

estão atentos a estes problemas, deixando completamente ao cargo do sector privado o descarte do óleo usado, sem acompanhar o processo ou aconselhar. Desta forma, é importante que seja decretado uma legislação generalizada da União Europeia ou a nível mundial, forçando o maior controlo nessa área. Para além, de ser importante uma uniformização do limite legal a ser aceite, pois num país um óleo de fritar com uma determinada percentagem de CPT pode ser aceitável enquanto noutro não, gerando confusão **(104)**. Na tabela VII estão representados alguns países onde o controlo de qualidade do óleo de fritar está legislado ou existem recomendações oficiais que devem ser consideradas no descarte do óleo de fritar.

**Tabela VII** Países que controlam a qualidade do oleo de fritar e os respectivos parâmetros, limites e legislações utilizadas.

|                  | Parâmetro     | Limite | Legislação                                | Referência        |
|------------------|---------------|--------|---|-------------------|
| <b>Alemanha</b>  | CPT           | 24%    | Legislação                                | <b>(105)</b>      |
|                  | Ponto de fumo | 170°C  |   |                   |
|                  | Polímeros     | 12%    |   |                   |
| <b>Austrália</b> | AGL           | 2,5%   | Recomendação                              | <b>(106)</b>      |
| <b>Áustria</b>   | CPT           | 27%    | Recomendação Codex Alimentarius Austríaco | <b>(107)</b>      |
| <b>Bélgica</b>   | AGL           | 2,5 %  | Legislação                                | <b>(108)</b>      |
|                  | Polímeros     | 10 %   |   |                   |
| <b>Brasil</b>    | CPT           | 25 %   | Recomendação ANVISA                       | <b>(109)</b>      |
|                  | AGL           | 0,9%   |   |                   |
|                  | AG linolenico | 2%     |   |                   |
| <b>Canadá</b>    | CPT           | 24%    | Recomendação Associação dos Restaurantes  | <b>(110)</b>      |
| <b>Espanha</b>   | CPT           | 25%    | Legislação                                | <b>(111)</b>      |
| <b>EUA</b>       | AGL           | 2%     | Recomendação                              | <b>(111)</b>      |
| <b>Finlândia</b> | AGL           | 2,5%   | Recomendação                              | <b>(106)</b>      |
| <b>França</b>    | AG linoleico  | 2%     | Legislação                                | <b>(111)</b>      |
|                  | CPT           | 25%    |   |                   |
| <b>Holanda</b>   | DTGP          | 16%    | Legislação                                | <b>(111, 112)</b> |
|                  | CPT           | 27%    |   |                   |
| <b>Hungria</b>   | CPT           | 30 %   | Legislação                                | <b>(113)</b>      |
| <b>Itália</b>    | CPT           | 25%    | Legislação                                | <b>(111)</b>      |
| <b>Japão</b>     | AGL           | 2,5%   | Recomendação                              | <b>(111)</b>      |
| <b>Portugal</b>  | CPT           | 25%    | Legislação                                | <b>(114)</b>      |
| <b>Suíça</b>     | CPT           | 27%    | Recomendação DFI                          | <b>(115)</b>      |

## 1.5. Apresentação da empresa

A Castro, Pinto & Costa, Lda, foi desenvolvida em 2000 como uma *spin off* da Universidade do Minho. Tendo a partir daí expandido as suas atividades tornando-se uma PME de excelência, sendo reconhecida como “PME Líder” em 2010 e 2011, para além de ser certificada pela ISO 9001 e pela ISO 4457.

As suas principais áreas de negócios são a formação profissional, laboratório de análise de alimentos e águas, a investigação e desenvolvimento, a comercialização de produtos e a consultoria/auditoria. A principal estratégia da CPC é a aposta na qualidade e na inovação, com uma constante atualização de conhecimentos e forte ligação ao meio académico.

A área de investigação e desenvolvimento é muito importante na empresa, tendo permitido desenvolver projetos como o Aquecimento Óhmico, que se insere no estudo do processamento de alimentos por aquecimento óhmico, e o mais importante o projeto OleoTest®. Outro sector muito importante é o laboratório de análise, LabMaia, que é acreditado pela 17025, e é responsável pelas análises microbiológicas e físico-químicas de águas e alimentos permitindo o controlo de qualidade de diversos produtos.

Apesar do objetivo deste trabalho centrar-se no estudo do desempenho OT, também colaborei noutras atividades da empresa, como na análise de alimentos e águas e na comercialização de produtos.

• • •

# Parte Experimental

• • •



## 2. Parte experimental

### 2.1. Material, Equipamento e Reagentes

Nas tabelas VIII, IX e X estão apresentadas algumas características dos equipamentos, do material de vidro e outro material e dos reagentes, respetivamente, utilizados no trabalho laboratorial.

**Tabela VIII** Equipamentos utilizados no trabalho laboratorial.

| Equipamentos               | Incerteza | Marca e Modelo                       |
|----------------------------|-----------|--------------------------------------|
| <i>Balança</i>             | 0,01 g    | Adventurec™ OHAUS                    |
| <i>Balança Analítica</i>   | 0,0001 g  | Acculab sartorius group ALC DT-BA001 |
| <i>Mufra</i>               | 1°C       | Nabertherm DTOU003 B105              |
| <i>Evaporador Rotativo</i> | -         | Heidolph Labotoys 4000 efficient     |
| <i>Estufa</i>              | 1°C       | Termarks                             |

**Tabela IX** Material de vidro e outro material, e respetiva incerteza associada, utilizado no trabalho laboratorial.

| Material de vidro             | Dimensões                           | Incerteza associada (ml) |
|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| <i>Balões Volumétricos</i>    | 500,00 ml                           | ± 0,25                   |
|                               | 50,00 ml                            | ± 0,06                   |
| <i>Provetas Graduadas</i>     | 500,0 ml                            | ± 2,5                    |
|                               | 100,0 ml                            | ± 0,5                    |
|                               | 50,0 ml                             | ± 0,5                    |
| <i>Pipetas volumétricas</i>   | 20,00 ml                            | ± 0,03                   |
| <i>Micropipeta</i>            | 1,000 ml                            | ± 0,001                  |
| <i>Balão de fundo redondo</i> | 250 ml                              | -                        |
| <i>Coluna Cromatográfica</i>  | 21 mm diâmetro x 450 mm comprimento | -                        |

**Tabela X** Fórmula química, marca e outras informações relativas aos solventes e materiais utilizados no trabalho laboratorial.

| Solvente/<br>material   | Fórmula<br>Química                              | Massa<br>Molecular<br>(g/mol) | Número CAS | Marca | Frases R               | Frases S                      |
|-------------------------|---|-------------------------------|------------|-------|------------------------|-------------------------------|
| <i>Éter de petróleo</i> | -   | -                             | 64742-49-0 | VWR   | R11-51/53-<br>65-66-67 | S9-16-23b-<br>24-33-61-<br>62 |
| <i>Éter dietílico</i>   | (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O | 74,12                         | 60-29-7    | VWR   | R12-19-22-<br>66-67    | S9-16-29-<br>33               |
| <i>Sílica Gel</i>       | SiO <sub>2</sub>                                | 60,08                         | 7631-86-9  | Merck | -                      | S22                           |
| <i>Areia</i>            | -   | -                             | 7631-86-9  | VWR   | -                      | -                             |

## 2.2. Amostragem

### 2.2.1. Amostras selecionadas

As amostras foram selecionadas de modo a obter uma grande variedade de amostras no que diz respeito a origem e ao grau de utilização das mesmas. Assim, foram selecionadas amostras derivadas de diferentes tipos de óleos de fritar, de diferentes origens e com diferentes percentagens de CPT. As amostras analisadas foram recolhidas em restaurantes locais, adquiridas em supermercados e enviadas por empresas de produtos fritos ou por laboratórios de investigação. A caracterização dos diferentes óleos de fritar analisados está apresentada na tabela XI. A cada amostra foi atribuído um código para uma fácil identificação ao longo do trabalho.

De forma a cumprir com os objetivos do trabalho foi necessário estudar uma gama variada de amostras com diferentes percentagens de CPT. Algumas das amostras recolhidas já eram usadas, ou seja, já tinham sido degradadas em processos de fritura, não havendo conhecimento de quais as condições de utilização. Outras foram adquiridas no seu estado virgem, no entanto eram necessárias amostras da mesma origem com percentagens de CPT diferentes. Nesses casos foi realizada a degradação das amostras em laboratório de forma controlada, com ciclos de aquecimento e arrefecimento e com uma duração de tempo de fritura aleatória. A degradação em laboratório não é o processo mais adequado por não imitar totalmente a utilização do óleo de fritar em superfícies comerciais ou industriais, para além de ser demorado e com custos indesejados, por isso as amostras foram recolhidas preferencialmente já degradadas.

### 2.2.1. Preparação da amostra

As amostras fluídas, límpidas e sem sedimento foram armazenadas num recipiente fechado de plástico à temperatura ambiente e protegidas da luz. As amostras sólidas ou semissólidas foram armazenadas nas mesmas condições, no entanto antes da sua utilização foi necessário um pré-aquecimento. Para isso foram usadas temperaturas controladas evitando o sobreaquecimento da amostra. Antes da sua utilização, todas as amostras foram agitadas de forma a serem homogeneizadas.

### 2.2.2. Estudo de estabilidade das amostras

A percentagem de CPT de duas amostras, U1 e U4, foi determinada no momento de recolha de amostra (tempo 0) e seis meses após a primeira análise (tempo 1), em duplicado. Determinou-se o desvio padrão relativo (DPR) de estabilidade do analito para cada amostra usando a equação 1, onde  $s$  corresponde ao desvio padrão das determinações e  $\bar{x}$  corresponde à média das determinações.

$$\% DPR = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

**Tabela XI** Algumas características das amostras analisadas no âmbito deste trabalho.

| Código             | Marca/ Origem                | País     | Natureza   | Condição        | Estado Físico |
|--------------------|------------------------------|----------|--|-----------------|---------------|
| U1                 | Fula                         | Portugal | Óleo alimentar                                     | Virgem          | Líquido       |
| U2 <sup>1</sup>    | Fula                         | Portugal | Óleo alimentar                                     | Usado           | Líquido       |
| U3 <sup>1</sup>    | Fula                         | Portugal | Óleo alimentar                                     | Usado           | Líquido       |
| U4 <sup>1</sup>    | Fula                         | Portugal | Óleo alimentar                                     | Usado           | Líquido       |
| U5 <sup>2</sup>    | Fula                         | Portugal | Óleo alimentar                                     | Usado           | Líquido       |
| U6                 | Auchan                       | Portugal | Óleo alimentar                                     | Virgem          | Líquido       |
| U7 <sup>3</sup>    | Empresa de produtos fritos   | Portugal | Óleo alimentar                                     | Usado           | Líquido       |
| F7910              | Empresa de I & D             | Espanha  | Óleo de Bagaço                                     | Virgem          | Líquido       |
| F7907 <sup>1</sup> | Empresa de I & D             | Espanha  | Óleo de Bagaço                                     | Usado           | Líquido       |
| F7908 <sup>1</sup> | Empresa de I & D             | Espanha  | Óleo de Bagaço                                     | Usado           | Líquido       |
| F7909 <sup>1</sup> | Empresa de I & D             | Espanha  | Óleo de Bagaço                                     | Usado           | Líquido       |
| F7911 <sup>1</sup> | Empresa de I & D             | Espanha  | Óleo de Bagaço                                     | Usado           | Líquido       |
| F7912 <sup>1</sup> | Empresa de I & D             | Espanha  | Óleo de Bagaço                                     | Usado           | Líquido       |
| PC01               | Top Q                        | Polónia  | Óleo de canola puro                                | Virgem          | Líquido       |
| PC02 <sup>2</sup>  | Top Q                        | Polónia  | Óleo de canola puro                                | 5h de fritura   | Líquido       |
| PC03 <sup>2</sup>  | Top Q                        | Polónia  | Óleo de canola puro                                | 7h de fritura   | Líquido       |
| PH01               | Pan Max                      | Polónia  | Óleo canola hidrogenado                            | Virgem          | Líquido       |
| PH02 <sup>2</sup>  | Pan Max                      | Polónia  | Óleo canola hidrogenado                            | 2h de fritura   | Líquido       |
| PH03 <sup>2</sup>  | Pan Max                      | Polónia  | Óleo canola hidrogenado                            | 6h de fritura   | Líquido       |
| OP01               | Olfryt Plus                  | Polónia  | Mistura de canola e palma                          | Virgem          | Semissólido   |
| OP02 <sup>2</sup>  | Olfryt Plus                  | Polónia  | Mistura de canola e palma                          | 2h de fritura   | Líquido       |
| OP03 <sup>2</sup>  | Olfryt Plus                  | Polónia  | Mistura de canola e palma                          | 6h de fritura   | Líquido       |
| OS01               | Olifryt Sun                  | Polónia  | Mistura de óleo de girassol (±60%), canola e palma | Virgem          | Líquido       |
| OS02 <sup>2</sup>  | Olifryt Sun                  | Polónia  | Mistura de óleo de girassol (±60%), canola e palma | 2h de fritura   | Líquido       |
| OS03 <sup>2</sup>  | Olifryt Sun                  | Polónia  | Mistura de óleo de girassol (±60%), canola e palma | 4,5h de fritura | Líquido       |
| FG01               | Olmaj Frytura Gastronomiczna | Polónia  | Óleo de palma (banha)                              | Virgem          | Sólido        |
| FP01               | Cook Baza Frytura Palmowa    | Polónia  | Óleo de palma (margarina)                          | Virgem          | Sólido        |
| A01                | Auchan                       | Portugal | Azeite (acidez 0,7%)                               | Virgem Extra    | Líquido       |
| A02 <sup>2</sup>   | Auchan                       | Portugal | Azeite (acidez 0,7%)                               | 1h de fritura   | Líquido       |
| A03 <sup>2</sup>   | Auchan                       | Portugal | Azeite (acidez 0,7%)                               | 3h de fritura   | Líquido       |
| AF995 <sup>1</sup> | S.A. Oleotest N.V            | Bélgica  | Gordura animal                                     | Usado           | Semissólido   |

<sup>1</sup> Amostras fornecidas, obtidas por processos de fritura descontínua.

<sup>2</sup> Amostras degradadas em laboratório

<sup>3</sup> Amostra fornecida, obtida de processos de fritura contínua



## 2.3. Determinação de Compostos Polares

### 2.3.1. Método oficial ISO 8420:2002

O método utilizado para determinar a percentagem CPT em óleos ou gorduras vegetais foi o método oficial ISO 8420:2002, *Animal and vegetable fats and oils – Determination of content of polar compounds (94)*. Neste método é utilizada uma coluna de adsorção de sílica e através da aplicação do eluente adequado é feita a separação dos compostos polares dos compostos não polares. O solvente de eluição usado foi uma mistura 87:13 de éter de petróleo e éter dietílico, que permite a retenção dos compostos polares na coluna e a eluição dos compostos não polares. Os compostos não polares foram recolhidos num balão de fundo redondo juntamente com o solvente de eluição, que foi posteriormente evaporado num evaporador rotativo.

A percentagem de CPT foi determinada por diferença usando a equação 2, onde  $m_f$  é a massa final do balão de fundo redondo (g),  $m_i$  é a massa inicial do mesmo balão (g),  $m_a$  é massa de amostra (g),  $V_t$  é o volume total da solução da amostra (ml) e  $V_e$  é o volume de solução da amostra eluída na coluna (ml).

$$\% \text{ CPT} = 100 - \frac{(m_f - m_i) \times 100}{m_a \times \frac{V_e}{V_t}} \quad \text{Equação 2}$$

#### 2.3.1.1. Validação do método

O método foi validado através da determinação de parâmetros de desempenho como a reprodutibilidade, a robustez à velocidade do fluxo e a exatidão.

A reprodutibilidade do método foi determinada usando duas amostras, a amostra U4 e a U5, por terem percentagens de CPT diferentes. Através dos resultados de reprodutibilidade foi também avaliado se a mesma coluna podia ser reutilizada.

A robustez do método foi avaliada em relação à velocidade do fluxo de eluição usando uma velocidade de 2,5ml/min (método oficial) e de 1,7ml/min para a análise da mesma amostra em duplicado por duas colunas.

A exatidão do método foi avaliada através da determinação da justeza e da precisão. Estes parâmetros foram determinados através da análise da amostra AF995, quantificada pelo laboratório belga "S.A. Oleotest N.V.", possuindo dessa forma um valor considerado verdadeiro e constituindo portanto uma amostra de referência. A precisão foi determinada a partir da dispersão das várias determinações da amostra, tendo-se determinado o DPR (equação 1) e a justeza do método foi determinada calculando o erro relativo (ER) (equação 3) e recorrendo ao teste  $t$  (equação 4).

$$ER (\%) = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

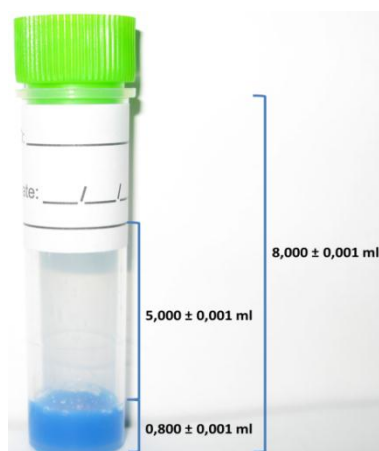
Onde  $\bar{x}$  corresponde ao valor médio das determinações e  $\mu$  corresponde ao valor considerado como verdadeiro.

$$t_{exp} = \frac{\bar{x} - \mu}{s} \times \sqrt{n} \quad \text{Equação 4}$$

Onde,  $s$  é o desvio padrão e  $n$  é o número de determinações. O valor de  $t$  foi considerado para 95% de probabilidade e  $n-1$  graus de liberdade.

### 2.3.2. Teste rápido OleoTest®

A figura 5 ilustra o *kit* do teste rápido onde estão assinaladas as capacidades da mistura reacional presente em cada teste ( $0,800 \pm 0,001$  ml), da amostra que deve ser utilizada ( $5,000 \pm 0,001$  ml) e o volume total de um tubo de teste ( $8,000 \pm 0,001$  ml).



**Figura 5** Ilustração de um OleoTest® e indicação da quantidade de mistura reacional, da quantidade de amostra que deve ser usada e do volume total do teste.

Os testes rápidos OT foram utilizados de acordo com o indicado na folha de instruções de utilização. Este teste requer apenas 5 ml de amostra e necessita de aquecimento para a mistura reacional derreter e se dissolver no óleo de fritar. Como as amostras utilizadas estavam à temperatura ambiente, foi necessário o aquecimento do tubo com a amostra no forno de micro-ondas em ciclos de 5 a 10 segundos seguido de uma agitação vigorosa para facilitar a dissolução da amostra na mistura reacional. Obtida uma mistura homogênea eram aguardados cerca de 2 min, e a resposta do teste era avaliada por dois analistas em condições de boa luminosidade em comparação com a tabela de cores apresentada na tabela V (secção 1.4.3.1.). O teste rápido OT possui cinco níveis de resposta correspondendo cada nível a um intervalo de percentagem de CPT, em que cada amostra deve gerar a cor característica do intervalo que contém a percentagem de CPT determinada através do método oficial.

### **2.3.2.1. Avaliação do desempenho do OleoTest®**

A avaliação do desempenho do OleoTest® foi realizada usando amostras com diferentes percentagens de CPT determinadas através do método ISO 8420:2002. Assim foram usadas as amostras U1, U2, U3, U4, U5, U6 e U7. A precisão do teste rápido foi também avaliada comparando os resultados obtidos pelo teste com os obtidos pela metodologia oficial ISO 8420:2002.

Determinou-se a robustez do teste a diferentes quantidades de mistura reacional e de amostra. Para isso usou-se testes com 1,6 ml, 0,8 ml e 0,4 ml de mistura reacional para analisar 5 ml de amostra e usou-se testes com 0,8 ml de mistura reacional para analisar 7 ml, 5 ml e 2,5 ml de amostra. Também foi determinada a robustez do método ao tempo de armazenamento, a estabilidade da resposta, para isso foram usados dois lotes diferentes, OT000339 (fora de prazo de validade à 2 anos e 9 meses) e OT100530 (dentro do prazo de validade) para analisar cinco amostras diferentes, e foi avaliada a resposta no momento, passado um mês e passados seis meses da realização do teste. Estudou-se também a robustez do teste à origem da amostra, para isso foram usadas duas amostras com mesmo nível de percentagem de CPT do OT, em que uma foi sujeita a uma fritura descontínua (U4) enquanto a outra foi sujeita a uma fritura contínua (U7).

Foi também realizado um estudo de validade de modo a aferir se o alargamento recente do prazo de validade, de 12 meses para 18 meses, é adequado determinando quando é que o OT deixa de dar respostas válidas. No estudo de validade foram selecionados vários lotes do teste rápido com base na sua data de validade e na quantidade de testes disponíveis. Nem todos os lotes foram avaliados em todos os níveis de percentagem de CPT, pois como o estudo de validade é feito com alguma regularidade, não foi necessário um estudo exaustivo.

O desempenho do OT foi também avaliado perante a utilização de amostras de diferentes tipos de óleos e gorduras de fritar. Para isso, testes rápidos OT foram utilizados para analisar diferentes amostras de óleos de canola, misturas de canola e palma, óleos de bagaço e azeite, com percentagens de CPT devidamente quantificadas pelo método oficial ISO 8420:2002.

As mesmas amostras foram analisadas com um outro teste recentemente lançado no mercado, por questões de confidencialidade, aqui é nomeado de teste A. Este teste foi adquirido no local de comercialização do mesmo e foi utilizado seguindo as instruções do folheto, a saber este teste utiliza 2 ml de amostra e não necessita de aquecimento, apenas de agitação vigorosa. Depois de obtida uma mistura homogénea esperou-se entre 1 a 2 min para avaliar a resposta do teste em comparação com a tabela de cores que acompanha esse teste rápido.

• • •

# **Apresentação e Discussão dos Resultados**

• • •



### 3. Apresentação e discussão dos resultados

O controlo de qualidade de óleos de fritura usados é muito importante por questões de saúde pública, como já referido ao longo deste trabalho. Os testes rápidos são uma ferramenta poderosa na implementação dos sistemas HACCP, pois permitem um controlo rápido, simples, no local e com resultados confiáveis da qualidade dos óleos de fritura usados. O OleoTest® é um teste rápido que cumpre com os requisitos de um teste rápido adequado, mas que ainda pode ser melhorado. Dessa forma, o objetivo deste trabalho centrou-se na avaliação da performance do OT e no estudo de novas formulações que possam superar algumas limitações da formulação atual.

#### 3.1. Estabilidade de analitos

A estabilidade reflete a capacidade da amostra manter as propriedades iniciais dos analitos, dentro de um período de tempo especificado, em condições de armazenamento definidas. A medição de estabilidade é aqui descrita em função da percentagem do desvio padrão relativo (DPR) do resultado obtido da medição após seis meses de armazenamento (tempo 1) em relação ao tempo zero, a análise inicial. Ao longo desses seis meses as amostras foram armazenadas no escuro e à temperatura ambiente. Os resultados obtidos para a determinação da estabilidade dos CPT em amostras de óleos de fritar estão resumidos na tabela XII.

**Tabela XII** Resultados da análise de CPT pelo método ISO de duas amostras, U1 e U4, na altura da recolha (tempo 0) e seis meses depois (tempo 1) com determinação do desvio padrão relativo (DPR) de estabilidade do analito para cada amostra.

| Amostras | Tempo | CPT (%)   | CPT (%) Média | DPR (%) de estabilidade do analito |
|----------|-------|-----------|---------------|------------------------------------|
| U1       | 0     | 6 ± 3     | 6 ± 2         | 4,4                                |
|          |       | 5 ± 2     |               |                                    |
|          | 1     | 6,1 ± 0,7 | 5,9 ± 0,5     |                                    |
|          |       | 5,6 ± 0,6 |               |                                    |
| U4       | 0     | 21 ± 3    | 21 ± 2        | 4,2                                |
|          |       | 21 ± 3    |               |                                    |
|          | 1     | 22 ± 3    | 22 ± 2        |                                    |
|          |       | 23 ± 3    |               |                                    |

A estabilidade de uma amostra durante um determinado período de tempo é considerada adequada quando o valor de DPR obtido é inferior a 20% (116). Analisando os resultados da tabela XII verifica-se que ambas as amostras podem ser consideradas estáveis durante pelo menos seis meses. Como as amostras possuem percentagens de CPT bastante diferentes pode-se também concluir que a quantidade de analito não influencia na estabilidade do mesmo pois o valor de DPR é semelhante para ambas as amostras.

### 3.2. Validação do método oficial ISO 8420:2002

A determinação de compostos polares em óleos e gorduras é feita segundo a ISO 8420:2002, *Animal and Vegetable fats and oils - Determination of content of polar compounds*. A avaliação do desempenho do método oficial foi realizada para que se pudesse tirar ilações sobre a importância dos testes rápidos e para validar o método utilizado na empresa.

Um método deve produzir resultados próximos quando determinados por medições repetidas em condições especificadas e da mesma forma que sejam próximos de um valor considerado verdadeiro. As condições da experiência variam em cada réplica, variando a solução de eluente que é preparada no momento da análise, o fluxo não é rigorosamente controlado, devido ao sistema utilizado e a solução da amostra que também é preparada no momento da análise. Por isso, a precisão dos resultados é aqui determinada por resultados de reprodutibilidade, como a variância de reprodutibilidade ( $S_{Ri}$ ), coeficiente de variação de reprodutibilidade ( $CV_R$ ) e limite de reprodutibilidade (R). Os resultados de reprodutibilidade foram também usados para determinar a validade de utilizar duas vezes consecutivas a mesma coluna cromatográfica. Assim, a tabela XIII apresenta os resultados obtidos para análise de duas amostras, a U4 e U5, em duplicado em duas condições diferentes, uma usando a mesma coluna e a outra usando duas colunas com enchimento de sílica novo.

**Tabela XIII** Resumo dos resultados estatísticos obtidos na análise de duas amostras, nomeadamente a percentagem de CPT para cada réplica e a respetiva média, a variância de reprodutibilidade ( $S_{Ri}$ ), o coeficiente de variação de reprodutibilidade ( $CV_R$ ) e o limite de reprodutibilidade (R).

| N.º de colunas usadas | Amostras |        |        |        |        |        |        |        |
|-----------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                       | U5       |        |        |        | U4     |        |        |        |
|                       | 1        |        | 2      |        | 1      |        | 2      |        |
| CPT (%)               | 31 ± 4   | 23 ± 3 | 35 ± 4 | 31 ± 4 | 21 ± 2 | 17 ± 2 | 21 ± 2 | 21 ± 2 |
| CPT (%) Média         | 27 ± 2   |        | 33 ± 3 |        | 19 ± 2 |        | 21 ± 2 |        |
| $S_{Ri}$              | 5,5      |        | 2,8    |        | 3,4    |        | 0,62   |        |
| $CV_R$ (%)            | 20       |        | 8,3    |        | 18     |        | 2,9    |        |
| R                     | 15       |        | 7,7    |        | 9,5    |        | 1,7    |        |

A tabela XIII mostra que os valores de reprodutibilidade obtidos quando é utilizada a mesma coluna para duas determinações da mesma amostra são muito elevados. Assumindo como critério de aceitação valores de  $CV_R$  de 10%, pode-se concluir que para resultados mais precisos deve-se utilizar duas colunas. Assim, todas as análises de CPT realizadas ao longo deste trabalho foram sempre realizadas utilizando novas colunas cromatográficas.

Analisando os resultados obtidos quando se utilizaram duas colunas pode-se verificar que os resultados obtidos estavam dentro dos critérios aceites. Estes resultados indicam que o método utilizado produz resultados precisos.

A exatidão do método indica a proximidade entre um resultado experimental e um valor convencionalmente aceite como verdadeiro. A determinação deste parâmetro é realizada através da determinação da justeza e da precisão e é muito importante na validação de um método permitindo aferir a fiabilidade dos resultados obtidos. No entanto, a inexistência de materiais de referência certificados ou amostras padrão de CPT em óleo de fritar dificulta a determinação deste parâmetro. Assim, para a determinação deste parâmetro foi utilizada uma amostra que foi previamente quantificada pelo laboratório “S.A. Oleotest N.V” havendo por isso um valor aceite como verdadeiro para a amostra considerada de referência.

**Tabela XIV** Resultados da análise de CPT de uma amostra de referência, AF995, e os respetivos parâmetros de desempenho: justeza, determinada pela avaliação dos erros sistemáticos, *t-student* experimental ( $t_{exp}$ ) e *t-student* tabelado ( $t_{tab}$ ), e do erro relativo (ER), e a precisão, determinada pela avaliação do desvio padrão relativo (DPR).

| Amostra | CPT              |            |                | Justeza   |           |        | Precisão |
|---------|------------------|------------|----------------|-----------|-----------|--------|----------|
|         | Experimental (%) |            | Referência (%) | $t_{exp}$ | $t_{tab}$ | ER (%) | DPR (%)  |
| AF995   | 10 ± 1           | 10,4 ± 0,9 | 9,2 ± 0,1      | 2,98      | 12,7      | 13     | 5,5      |
|         | 11 ± 1           |            |                |           |           |        |          |

Na tabela XIV estão apresentados os valores de justeza e de precisão determinados para a amostra AF995. A justeza do método é determinada através do erro relativo assumindo um critério de aceitação abaixo dos 10%. Na tabela XIV pode-se verificar que o valor do erro relativo é superior ao critério de aceitação, assim foi realizado um teste *t student* para inferir sobre a presença de erros sistemáticos. Como o  $t_{exp}$  é inferior ao  $t_{tab}$  pode-se concluir que não há evidências da existência de erros sistemáticos com 95% de confiança. A precisão do método é determinada através do valor de DPR, este valor é de 5,5% sendo inferior a 10% podendo-se inferir que o método é preciso. Com estes resultados pode-se concluir que apesar de apresentar um erro relativo um pouco elevado, pode ser considerado que o método produz resultados com uma boa exatidão.

Apesar de ter permitido tirar algumas ilações sobre a exatidão do método estes parâmetros deveriam ser determinados usando 10 réplicas da mesma amostra e não duas como foi o caso. No entanto, a realização de análises com as colunas cromatográficas tem elevados custos associados não sendo do interesse da empresa a realização de tantas réplicas da mesma amostra.

Num método cromatográfico o fluxo do eluente deve ser controlado para que seja feita a separação correta do composto pretendido, havendo no entanto um pequeno intervalo de variação que é permitido. O método ISO indica que devem ser eluídos 150 ml de eluente entre



60 e 70 minutos. Assim, de forma a avaliar a influência de usar um fluxo mais lento a mesma amostra foi analisada pelo método ISO usando um fluxo de 2,5 ml/min (valor indicado no método) e um fluxo de 1,7 ml/min e os resultados são apresentados na tabela XV.

**Tabela XV** Percentagem de CPT de uma mesma amostra usando o método ISO, mas variando a velocidade do fluxo de eluição acompanhado pelo coeficiente de variação de reprodutibilidade ( $CV_R$ ).

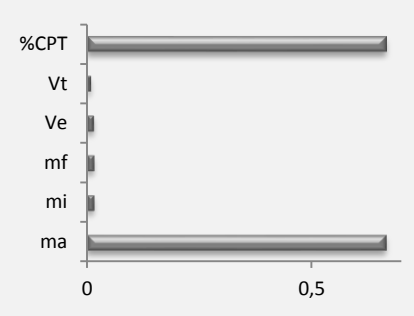
| Fluxo (ml/min) | Réplicas | CPT (%) | CPT (%) Média | $CV_R$ (%) |
|----------------|----------|---------|---------------|------------|
| 2,5            | 1        | 21 ± 2  | 21 ± 2        | 3,1        |
|                | 2        | 20 ± 2  |               |            |
| 1,7            | 1        | 24 ± 3  | 24 ± 2        | 1,9        |
|                | 2        | 23 ± 3  |               |            |

Analisando a tabela XV é possível verificar que os resultados não se mantêm os mesmos com a alteração do fluxo, verificando-se uma diferença de 3% na percentagem de compostos polares. Estes resultados permitem concluir que o controlo do fluxo é muito importante, devendo ser respeitada a velocidade de 2,5 ml/min indicada.

Os erros associados a um resultado caracterizam a dispersão dos valores permitindo, entre outras coisas, avaliar a fiabilidade dos resultados e por sua vez a fiabilidade do método. Considerando que um resultado pode ser afetado por diversas fontes de incerteza, apresenta-se na tabela XVI as fontes de incerteza associadas à percentagem de CPT para uma amostra exemplo.

Na tabela XVI pode-se verificar que numa amostra com 5,7 % de CPT existe uma incerteza de  $\pm 0,7$  % e é facilmente visível na representação gráfica que a componente com maior influência é a pesagem da massa da amostra. Esta influência pode ser justificada pelo facto de se pesar uma massa muito pequena quando comparada com a massa dos balões usados. Assim este passo deve ser feito com muito rigor, sendo que a balança analítica deve ser devidamente calibrada e usada. Note-se que numa amostra com uma percentagem de CPT baixa, um erro de quase 1% é um erro muito elevado. A situação crítica consiste na análise de amostras de concentrações no limiar do limite legal (24%) onde pode ser feita uma decisão incorreta sobre a reutilização do óleo. Assim, a quantificação de CPT pelo método ISO pode gerar resultados com valores de incertezas demasiado elevados, havendo pouca confiança nos resultados obtidos.

**Tabela XVI** Quadro resumo das fontes de incerteza que afetam o resultado obtido pelo método ISO para uma amostra exemplo, apresentando a respetiva grandeza (x), a sua incerteza combinada ( $u_c(x)$ ) e relativa ( $u(x)/x$ ) e incluindo a representação gráfica das componentes da incerteza.

|              | Valor x  | $u_c(x)$ | $u(x)/x$ | Representação gráfica das componentes da incerteza                                 |
|--------------|----------|----------|----------|--|
| $m_a$ (g)    | 2,5026   | 0,29     | 0,12     |  |
| $m_{bi}$ (g) | 113,5475 | 0,29     | 0,0026   |  |
| $m_{bf}$ (g) | 114,4912 | 0,29     | 0,0025   |  |
| $V_e$ (ml)   | 20       | 0,05     | 0,0025   |  |
| $V_t$ (ml)   | 50       | 0,07     | 0,0014   |  |
| CPT (%)      | 5,7      | 0,7      | 0,1      |  |

Apesar de este método ser amplamente usado e aceite a sua validação é dificultada pela falta de materiais de referência ou amostras padrão. A elaboração de amostras padrão de compostos polares numa matriz semelhante às amostras ainda não está aperfeiçoada, nem é muito estudada.

A aplicação do método ISO 8420:2002 requer equipamento específico, espaço laboratorial, pessoal especializado, entre outras coisas que inviabiliza a utilização deste nos locais de produção de produtos fritos. Estes problemas acoplados com os discutidos neste trabalho de sensibilidade à mudança de fluxo, erros associados relativamente elevados e a inexistência de amostras padrão que comprovem a fiabilidade dos resultados, tornam fundamental a implementação de testes rápidos com resultados fiáveis, rápidos e fáceis de se usar.

### 3.3. Avaliação do desempenho do teste rápido OleoTest®

#### 3.3.1. Fiabilidade dos resultados do OleoTest®

A avaliação do desempenho do OT foi realizada com o auxílio de diversas amostras, com diferentes percentagens de CPT devidamente quantificadas pelo método ISO 8420:2002, cujos resultados são apresentados na tabela XVII.

Os resultados das amostras analisadas encontram-se de acordo com o respetivo nível da tabela de cores do OT, com exceção da amostra U3 e a U6. A amostra U3 possui uma percentagem de CPT no limite entre o nível 2 e o nível 3, sendo que qualquer uma das respostas no teste rápido seriam aceites. No entanto, segundo estudos realizados pelos produtores do teste o comportamento normal do teste em casos destes é indicar o nível superior, ou seja, o nível 3 **(96)**. O mesmo se deve verificar para a amostra U6, neste caso indicando o nível 2.

**Tabela XVII** Amostras usadas na avaliação do desempenho do OT acompanhadas pela respetiva percentagem de CPT determinada pelo método ISO 8420:2002 e pelo resultado do OT.

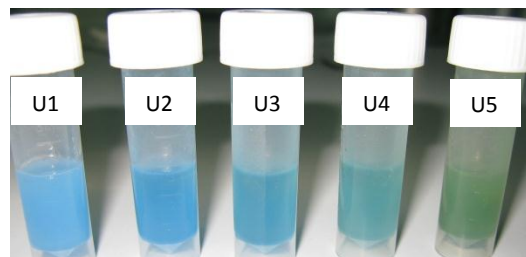
| Amostra | Réplicas | Método ISO |               |                     | OleoTest®              |
|---------|----------|------------|---------------|---------------------|------------------------|
|         |          | CPT (%)    | CPT (%) Média | CV <sub>R</sub> (%) | Resultado              |
| U1      | 1        | 5,7 ± 0,7  | 5,5 ± 0,5     | 5,1                 | Nível 1<br>(<5%)       |
|         | 2        | 5,3 ± 0,6  |               |                     |                        |
| U2      | 1        | 7,7 ± 0,9  | 7,7 ± 0,6     | 0,092               | Nível 2<br>(6% - 12%)  |
|         | 2        | 7,7 ± 0,9  |               |                     |                        |
| U3      | 1        | 12 ± 1     | 13 ± 1        | 10                  | Nível 3<br>(13% - 16%) |
|         | 2        | 14 ± 2     |               |                     |                        |
| U4      | 1        | 21 ± 2     | 21 ± 2        | 2,9                 | Nível 4<br>(17% - 23%) |
|         | 2        | 21 ± 2     |               |                     |                        |
| U5      | 1        | 35 ± 4     | 33 ± 3        | 8,3                 | Nível 5<br>(>24%)      |
|         | 2        | 31 ± 4     |               |                     |                        |
| U6      | 1        | 5,8 ± 0,7  | 6,0 ± 0,5     | 4,7                 | Nível 2<br>(6% - 12%)  |
|         | 2        | 6,2 ± 0,7  |               |                     |                        |
| U7      | 1        | 19 ± 2     | 18 ± 2        | 7,0                 | Nível 4<br>(17% - 23%) |
|         | 2        | 17 ± 2     |               |                     |                        |

Como já referido anteriormente, existe um conjunto de requisitos que é importante que um teste rápido preencha (tabela IV secção 1.4.1), entre esses encontra-se a correlação de resultados com o método oficial. Assim, o OT foi usado para analisar cinco amostras, U1, U2, U3, U4 e U5, devidamente quantificadas em termos de CPT através do método oficial ISO 8420:2002 (tabela XVII). As respostas dos testes realizados podem ser visionados na figura 6 e estão apresentadas também na tabela XVII, sendo possível aferir que o teste rápido OT apresentou resultados concordantes com os resultados do método oficial, para todas as amostras, demonstrando a fiabilidade dos resultados obtidos por este teste. A amostra U3 pode gerar algumas dúvidas na interpretação da cor, mas é necessário ter em atenção que a percentagem de CPT determinada pelo método oficial foi de  $13 \pm 1$  %. Sendo que 12% de CPT corresponde ao nível 2 da tabela do OT enquanto 13% de CPT corresponde ao nível 3, pode-se verificar que a percentagem de CPT da amostra U3 é no limiar de dois níveis, considerando também a incerteza associada, podendo a cor obtida ser de difícil interpretação.



**Figura 6** Fotografia dos testes OT realizados na avaliação de cinco amostras.

As mesmas amostras foram analisadas pelo teste rápido A, cujas respostas se encontram na figura 7. Alguns testes foram adquiridos para que pudesse ser avaliado o seu comportamento e comparar os resultados obtidos com os do OT.



**Figura 7** Fotografia dos testes A realizados na avaliação de cinco amostras.

Do mesmo modo que o OT os resultados do teste A são comparados com uma tabela de cores que identifica quatro níveis de percentagem de CPT (tabela XVIII). Analisando a figura 7 são visíveis três cores diferentes, a amostra U1, U2 e U3 são identificados no mesmo nível, a amostra U4 tem uma pequena diferença de cor e a amostra U5 é claramente de um nível diferente.

**Tabela XVIII** Resposta apresentada pelo teste rápido A de determinação de CPT mediante a percentagem de CPT presente na amostra.

| Percentagem de CPT | Nível do teste A |
|--------------------|------------------|
| < 10 %             | 1                |
| > 10 - < 12 %      | 2                |
| > 12 - < 17 %      | 3                |
| > 17 %             | 4                |

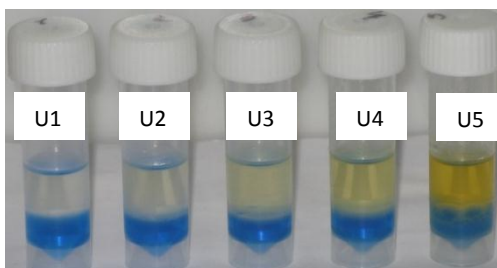
Na tabela XIX estão os resultados do teste A, do OT e os obtidos pelo método oficial, permitindo verificar que a resposta do teste A não é de fácil interpretação podendo resultar numa leitura de resultados não correlacionáveis com o método oficial.

**Tabela XIX** Percentagem de compostos polares em cinco amostras, determinada através do método ISO 8420:2002 (método oficial) e dos testes rápidos OT e A.

| Amostra | Percentagem de Compostos Polares Totais |                        |                          |
|---------|---|------------------------|--------------------------|
|         | Método oficial                          | OleoTest®              | Teste A                  |
| U1      | 5,5 ± 0,5 %                             | Nível 1<br>(< 5%)      | Nível 1<br>(< 10%)       |
| U2      | 7,7 ± 0,6 %                             | Nível 2<br>(6% - 12%)  | Nível 1<br>(< 10%)       |
| U3      | 13 ± 1 %                                | Nível 3<br>(13% - 16%) | Nível 1<br>(< 10%)       |
| U4      | 21 ± 2 %                                | Nível 4<br>(17% - 23%) | Nível 1<br>(< 10%)       |
| U5      | 33 ± 3 %                                | Nível 5<br>(>24%)      | Nível 3<br>(>12% a <17%) |

Para além da correlação com o método oficial é também importante que a resposta do teste rápido seja estável mantendo se inalterada durante longos períodos de tempo, de modo a que possa ser usada como ferramenta num sistema de controlo de qualidade. Na utilização

do teste A verificou-se que após 10 minutos havia separação entre o óleo e o reagente alterando a resposta. Com o passar do tempo a separação entre o reagente e o óleo foi total tendo desaparecido completamente a resposta do teste (figura 8). A dissolução permanente do óleo no reagente é importante pois assim são conservadas as propriedades do óleo não havendo degradação ao longo do tempo que pode originar uma resposta errônea.



**Figura 8** Fotografia tirada aos testes A realizados na análise das amostras U1, U2, U3, U4 e U5 após 24h.

Apenas foram analisadas cinco amostras com cinco testes, uma amostragem tão pequena não permite que sejam tiradas conclusões sobre o desempenho do teste A, apenas permite verificar alguns indícios. Assim, os resultados indicam que o OT obtém respostas mais fiáveis e mais estáveis do que as obtidas com o teste A. Para além disso, o OT indica o ponto de descarte aos 24% enquanto o teste A indica esse ponto aos 17%. Sendo o limite legal de percentagem de CPT em óleos usados de 25% em Portugal (**114**) o OT permite maximizar a utilização do óleo.

### 3.3.2. Robustez do método

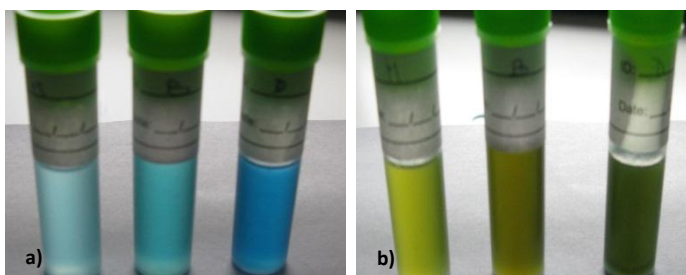
Os testes rápidos utilizados para o controlo de qualidade de óleos de fritar usados devem ser fáceis de usar de modo a não ser necessária a contratação de pessoal especializado. A utilização do OT é muito simples, sendo apenas necessária a dissolução da amostra na mistura reacional presente num tubo. A dissolução correta da amostra na mistura reacional deve ser assegurada, de modo a que ocorra a ligação de todos os compostos polares ao reagente químico presente na mistura, para que a resposta do teste seja confiável. O facto da mistura reacional ser um gel torna necessário um breve aquecimento da mistura amostra/gel de modo a permitir a homogeneização destes. Assim, o único fator de perigo na manipulação deste teste rápido é a temperatura, mas, no entanto, os produtores do OT disponibilizam um suporte anti-queimadura em cada caixa, para a proteção do utilizador.

Um teste rápido deve ser robusto, resistente a condições adversas e ser capaz de manter a mesma resposta durante longos períodos de tempo. De modo a avaliar a robustez deste teste rápido foi estudada a influência da quantidade de mistura reacional usada, da

quantidade de amostra usada, do tempo de armazenamento e da origem da amostra, podendo ser originária de uma fritura contínua ou de uma fritura descontínua.

### 3.3.2.1. *Influência da quantidade de mistura reacional e de amostra*

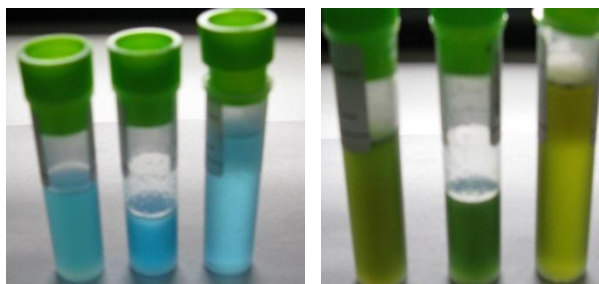
A quantidade de mistura reacional presente em cada tubo de OT foi determinada pelos produtores deste teste rápido após vários estudos, determinando o volume ótimo de 0,8 ml de mistura reacional **(96)**. A figura 9 mostra fotografias dos testes rápidos com três quantidades de mistura reacional diferentes, 1,6 ml, 0,8 ml e 0,4 ml, usados na análise duas amostras de óleos, U1 e U5



**Figura 9** Fotografias obtidas nos dias da análise, dos testes rápidos para avaliar a influência da quantidade de mistura reacional na resposta do teste da amostra: **a)** U1; **b)** U5. *Esquerda para a direita: 0,4ml, 0,8ml e 1,6ml de mistura reacional.*

Através da análise da figura 9 pode se verificar que a quantidade de mistura reacional altera a intensidade de cor da resposta do teste, podendo levar a uma medição incorreta da percentagem de CPT. Quando é usada uma quantidade excessiva de mistura reacional a resposta torna-se mais intensa dando a percepção de que a quantidade de CPT presente é menor do que a real. Por outro lado, quando é usada uma menor quantidade de mistura reacional a resposta do teste torna-se muito tênue mas pelas amostras usadas parece que continua a indicar o nível de CPT correto. A quantidade de mistura reacional apesar de influenciar a resposta do teste, não influencia a estabilidade da resposta mantendo a mesmo durante longos períodos de tempo.

A quantidade de amostra usada para a realização do teste também foi aperfeiçoado pelos produtores deste teste rápido de modo a que resposta obtida pudesse ser relacionada com a percentagem de CPT **(96)**. A figura 10 mostra os testes usados para analisar 7 ml, 5 ml e 2,5 ml de amostra, de duas amostras diferentes, U1 e U5.

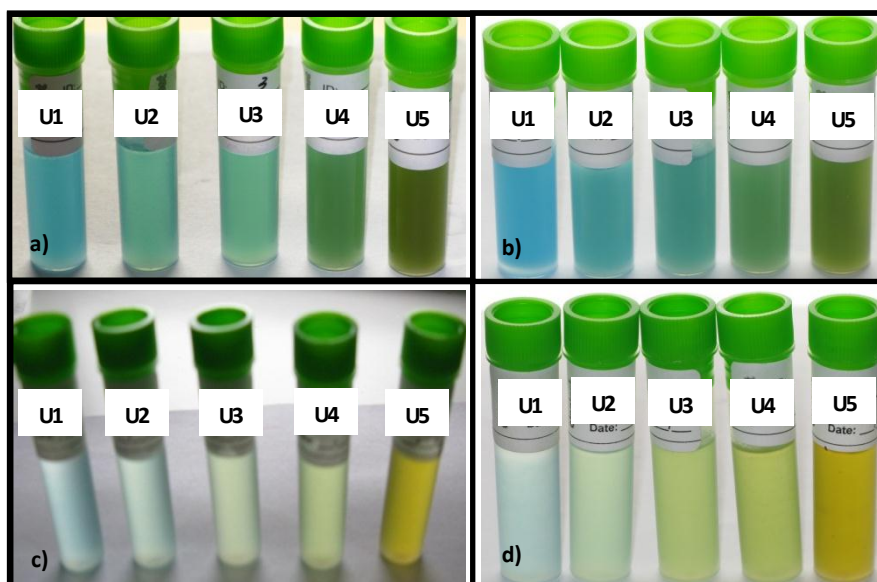


**Figura 10** Fotografias obtidas no dia da análise, dos testes rápidos realizados para avaliar a influência da quantidade de óleo na resposta do teste da amostra: **a)** U1; **b)** U5. *Esquerda para a direita: 5 ml, 2,5 ml e 7 ml de amostra.*

A figura 10 apresenta a influência que a quantidade de óleo exerce na resposta obtida pelo OT, podendo verificar que esta altera a intensidade da resposta. A maior influência exercida é verificada quando é usada menor quantidade de amostra tornando a resposta mais intensa, levando a uma identificação errada do nível de percentagem de CPT. Quando se usa maior quantidade de amostra a resposta é pouco influenciada mantendo a mesma cor e representando o mesmo nível de percentagem de CPT.

### 3.3.2.2. *Influência do tempo de armazenamento*

Uma característica importante num teste rápido é a sua estabilidade, a sua capacidade de manter a mesma resposta durante longos períodos de tempo permitindo a utilização destes como parte integrante do sistema de qualidade. A estabilidade do OT foi avaliada usando dois lotes diferentes, OT000339 (fora de prazo de validade à 2 anos e 9 meses) e OT100530 (dentro do prazo de validade), e cinco amostras representativas dos cinco níveis do teste rápido OT.



**Figura 11** Fotografias dos testes rápidos para avaliar a estabilidade destes ao longo do tempo do lote: **a)** OT100530, que está dentro do prazo de validade, obtidas no momento da realização dos testes; **b)** OT100530, que está dentro do prazo de validade, obtidas um mês depois da realização dos testes; **c)** OT000339, que está fora do prazo de validade, obtidas no momento da realização dos testes; **d)** OT000339, que está fora do prazo de validade, obtidas um mês depois da realização dos testes.

Analisado a figura 11 pode se concluir que o teste rápido OT, quer dentro de validade como fora de validade, apresenta uma boa estabilidade, apresentando a mesma resposta durante um mês. Os testes usados para estudo foram armazenados à temperatura ambiente e no escuro. Passados seis meses, foram avaliadas as suas respostas e verificou-se que estes apresentavam a mesma resposta que no dia da realização do teste. Isto vai de acordo com os estudos inicialmente feitos pelos produtores do OT **(96)**. Em ambos os casos, tanto dentro de validade como fora de validade, o OT manteve uma resposta estável, significando que o prazo de validade não influencia na estabilidade da resposta.

### **3.3.2.3. Influência da origem da amostra**

Os óleos de fritar podem ser sujeitos a diferentes processos de fritura, podendo estes ser contínuos ou descontínuos. Para verificar se a origem da amostra influencia no desempenho do OT foi usada uma amostra originária de um processo de fritura contínuo, amostra U7, e uma amostra que originária de um processo de fritura descontínuo, amostra U4, ambas amostras de óleos alimentares. Ambas as amostras foram analisadas pelo método ISO 8420:2002 sendo quantificadas com uma percentagem de CPT correspondente ao nível 4 do OT (tabela XVII).



**Figura 12** Fotografia de duas amostras representativas do nível 4 do OleoTest® (entre 17% e 21%). Amostra U4 foi obtida através de um processo de fritura descontínua enquanto a amostra U7 foi obtida através de um processo de fritura contínua.

Na figura 12 está representada a resposta obtida pelo OT na análise da amostra U4 e U7, permitindo aferir que a resposta de ambas as amostras, em comparação com a tabela de cores (tabela V), indica que as amostras se encontram no nível 4, o que é concordante com os resultados obtidos recorrendo ao método oficial. É visível uma pequena diferença na intensidade de cores (figura 12), no entanto ambas as cores são aceites para o nível 4. Esta pequena diferença de cores pode estar relacionada com o fato de a amostra U7 possuir um depósito, provavelmente originário dos alimentos usados neste óleo.



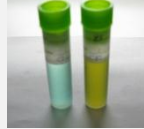
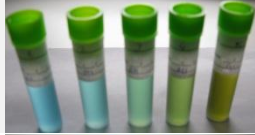
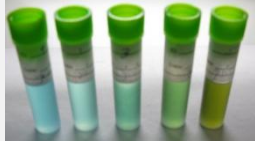
### 3.3.3. Estudo de validade

O teste rápido OT já é produzido e comercializado desde 2002 pela Castro, Pinto & Costa. Atualmente, são produzidos novos lotes todos os meses, cada um de várias dezenas de milhares de testes e que são posteriormente comercializados, normalmente, em conjuntos de 10, 25 ou 50 testes. Por questões de controlo de qualidade, são sempre armazenados testes representativos de cada lote em condições adequadas (local fresco e seco e ao abrigo da luz). O estudo de validade dos lotes presentes na empresa é um processo feito com alguma frequência, e por isso não foi necessário um estudo pormenorizado. Recentemente a data de validade do teste foi alargada passando de 12 meses para 18 meses. Deste modo, este estudo de validade tem por objetivo averiguar se o alargamento do prazo de validade foi adequado.

O lote OT000339 possuía uma data de validade de Janeiro de 2009, e foi usado como controlo negativo de modo a dar a conhecer o comportamento do OT quando completamente fora de validade. Por outro lado, o lote OT100530 possuía uma data de validade de Abril de 2013, era o lote mais recente da altura, e foi usado como um controlo positivo de modo a conhecer a resposta que o OT a funcionar corretamente deve apresentar para as amostras usadas.

Na tabela XX estão apresentados os resultados obtidos pelos diferentes lotes de testes realizados às diferentes amostras acompanhados por comentários que resumem as conclusões tiradas para cada lote, assim como imagens que auxiliam no entendimento dos resultados.

**Tabela XX** Resumo dos resultados obtidos pelos vários testes dos diferentes lotes para as diferentes amostras, acompanhados por comentários e fotografias dos testes realizados.

| Oleotest®<br><i>Lote e Validade</i> | Nível do OT por amostra |     |     |     |    |    |    | Comentários   |
|-------------------------------------|-------------------------|-----|-----|-----|----|----|----|---|
|                                     | U1                      | U2  | U3  | U4  | U5 | U6 | U7 |   |
| OT000339<br>Janeiro 2009            | 1/2                     | 1/2 | 3/4 | 3/4 | 5  | -  | -  | São visíveis patamares de cores apesar serem muito ténues  |
| OT000426<br>Outubro 2010            | -                       | -   | -   | -   | 5  | 1  | -  | Cores continuam identificáveis, apesar de bem mais claras  |
| OT000445<br>Abril 2011              | 1                       | 2   | 3   | 4   | 5  | -  | -  | Cores um pouco mais claras mas níveis identificáveis       |
| OT000460<br>Julho 2011              | 1                       | 2   | 3   | 4   | 5  | -  | -  | Cores um pouco mais claras mas níveis identificáveis       |

| Oleotest®                 | Nível do OT por amostra |    |    |    |    |    |    | Comentários                                     |   |
|---------------------------|-------------------------|----|----|----|----|----|----|---|---|
|                           | Lote e Validade         | U1 | U2 | U3 | U4 | U5 | U6 |   | U7  |
| OT000465<br>Agosto 2011   | -                       | -  | -  | 4  | 5  | 1  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |    |
| OT100469<br>Abril 2012    | 1                       | 2  | 3  | 4  | 5  | -  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |    |
| OT100473<br>Maio 2012     | -                       | 2  | -  | 4  | 5  | -  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |    |
| OT100478<br>Junho 2012    | -                       | -  | 3  | 4  | 5  | -  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |    |
| OT100482<br>Julho 2012    | -                       | 2  | -  | 4  | 5  | -  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |   |
| OT100486<br>Agosto 2012   | -                       | -  | -  | 4  | 5  | 1  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |  |
| OT100495<br>Setembro 2012 | 1                       | -  | -  | 4  | 5  | -  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |  |
| OT100499<br>Outubro 2012  | -                       | 2  | -  | 4  | 5  | -  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |  |
| OT100503<br>Novembro 2012 | 1                       | -  | 3  | -  | 5  | -  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |  |
| OT100508<br>Dezembro 2012 | 1                       | -  | 3  | -  | 5  | -  | -  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |  |
| OT100530<br>Abril 2013    | 1                       | 2  | 3  | 4  | 5  | 1  | 4  | Cores adequadas, fácil identificação dos níveis |  |

Começando por analisar o controlo positivo (lote OT100530) é possível verificar que todas as amostras analisadas apresentam a cor expectável, correlacionável com o método oficial, sendo esta facilmente identificável com o nível correspondente. Por outro lado, o controlo

negativo (lote OT000339) revela que quando fora de prazo as cores do OT ficam mais ténues e menos identificáveis com os níveis da tabela de cores do teste, deixando de existir 5 níveis mas sim 3 níveis.

Através da análise dos resultados apresentados na tabela XX e tendo em conta os resultados do controlo positivo e do controlo negativo, é possível aferir que os lotes dentro da validade originam resultados confiáveis e correlacionáveis com os resultados obtidos pelo método oficial (tabela XVII). Também se pode verificar que os lotes que tinham sido marcados com validade de 12 meses, como OT000465 e que estava fora de validade mas ainda dentro dos 18 meses de validade, ainda manteve bons resultados, coerentes com o controlo positivo e correlacionáveis com o método oficial. Assim, o alargamento da data de validade dos lotes de 12 meses para 18 meses é adequado, pois os testes mantêm a sua performance ao longo desse período de tempo.

Analisando também outros lotes mais antigos, como o OT000426, OT000445 e o OT000460, é possível verificar que mesmo fora de prazo por quase um ano o OT continua a dar resultados que são correlacionáveis com o método oficial. No entanto, os resultados apresentam cores mais claras e menos intensas impedindo uma leitura fácil do nível correspondente por parte do operador.

Na análise de amostras com percentagem de CPT no limite dos níveis correspondentes do OT, como no caso da amostra U3 e U6, a leitura do resultado do teste pode ser dificultada, pois a cor obtida no teste rápido pode não ser a cor característica do nível. Uma forma de superar essa dificuldade é ter mais do que um operador a avaliar a resposta do teste, de modo a minimizar a subjetividade do teste.

#### **3.3.4. Desempenho do teste rápido com diferentes tipos de óleos ou gorduras**

As gorduras ou óleos usados no processo de fritura podem ter diferentes origens, sendo por isso importante que a resposta do teste rápido utilizado para o controlo de qualidade destes não seja influenciada pela origem da gordura ou óleo usado. Antes de lançado no mercado, o OT foi testado com diversos óleos de fritar, como o óleo alimentar, o óleo de milho, de soja e de girassol, demonstrando uma boa funcionalidade com estes óleos e sendo mais utilizado com óleos alimentares. Atualmente, com a internacionalização do OT diversos clientes começam a inquirir sobre a aplicabilidade deste teste rápido com outros óleos de fritar. Assim foi estudada a aplicabilidade deste teste com óleos de canola e gorduras de palma, muito utilizados na Polónia, com óleo de bagaço e com azeite, gorduras muito utilizadas na Espanha.

### 3.3.4.1. Óleo de canola e de palma

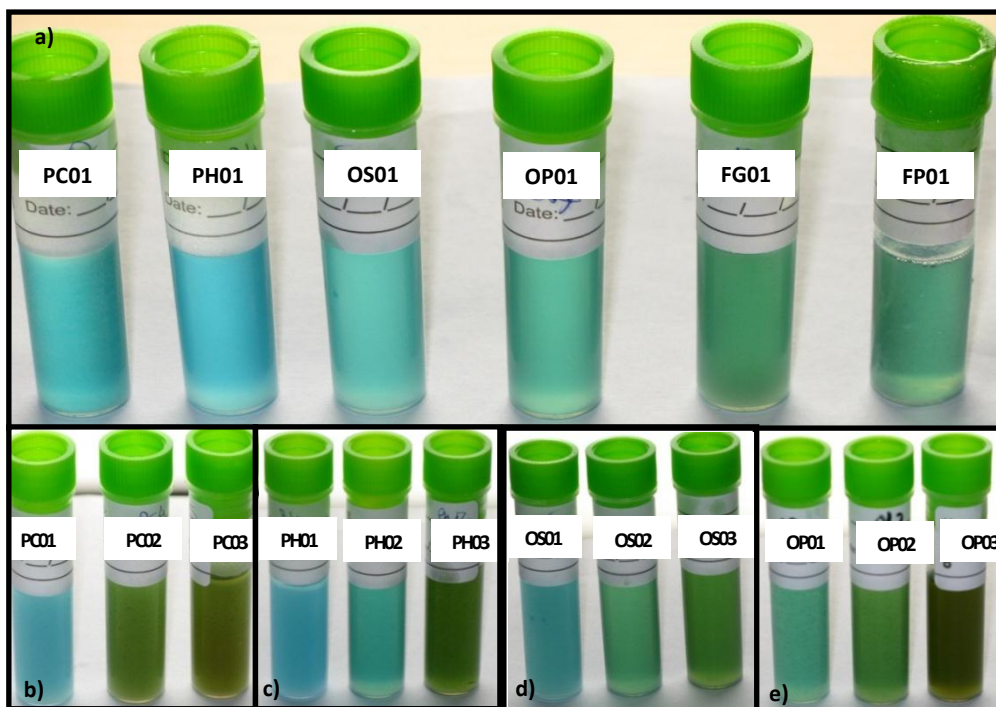
O desempenho do OT perante a utilização de óleos de canola e de palma foi avaliado usando amostras provenientes da Polónia, de diversas marcas e composições todas virgens acondicionadas em recipientes fechados. Para um estudo adequado foi necessário degradar as amostras de modo a obter amostras representativas de mais do que um nível de resposta do OT. A lista das amostras usadas acompanhadas pelas suas composições e condições estão enumeradas na tabela XI da secção 2.2.1 deste trabalho.

Todas as amostras utilizadas foram devidamente caracterizadas em termos de compostos polares através do método oficial ISO 8420:2002 sendo depois analisadas pelo OT. Os resultados encontram-se resumidos na tabela XXI e a figura 13 ilustra os resultados obtidos pelo OT para cada amostra. A interpretação dos resultados obtidos deve ter em conta que o tamanho da amostragem não é suficiente para tirar conclusões mas ajudam a ter uma ideia do comportamento do OT na análise destas amostras.

**Tabela XXI** Percentagem de compostos polares nas amostras de óleos de canola e palma, determinado através do método ISO 8420:2002 (método oficial) e pelo teste rápido OT.

| Amostra | Réplicas | Método ISO |                  |                     | OleoTest®              |                        |
|---------|----------|------------|------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
|         |          | CPT (%)    | CPT (%)<br>Média | CV <sub>R</sub> (%) | Lote e<br>validade     | Resultado              |
| PC01    | 1        | 5,6 ± 0,7  | 5,5 ± 0,5        | 3,0                 | OT100520<br>Março 2013 | Nível 1<br>(<5%)       |
|         | 2        | 5,4 ± 0,6  |                  |                     |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
| PC02    | 1        | 13 ± 2     | 14 ± 1           | 5,7                 |                        | Nível 5<br>(>24%)      |
|         | 2        | 14 ± 2     |                  |                     |                        | Nível 1<br>(<5%)       |
| PC03    | 1        | 25 ± 3     | 25 ± 2           | 2,5                 |                        | Nível 2<br>(6% - 12%)  |
|         | 2        | 26 ± 3     |                  |                     |                        | Nível 4<br>(17% - 23%) |
| PH01    | 1        | 7,7 ± 0,9  | 7,7 ± 0,6        | 0,92                |                        | Nível 1<br>(<5%)       |
|         | 2        | 7,6 ± 0,8  |                  |                     |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
| PH02    | 1        | 14 ± 2     | 13 ± 1           | 2,6                 |                        | Nível 4<br>(17% - 23%) |
|         | 2        | 13 ± 2     |                  |                     |                        | Nível 1<br>(<5%)       |
| PH03    | 1        | 24 ± 3     | 24 ± 2           | 1,3                 |                        | Nível 2<br>(6% - 12%)  |
|         | 2        | 25 ± 3     |                  |                     |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
| OS01    | 1        | 4,4 ± 0,5  | 5,5 ± 0,5        | 28                  |                        | Nível 4<br>(17% - 23%) |
|         | 2        | 6,6 ± 0,8  |                  |                     |                        | Nível 1<br>(<5%)       |
| OS02    | 1        | 14 ± 2     | 13 ± 1           | 4,7                 |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
|         | 2        | 13 ± 2     |                  |                     |                        | Nível 4<br>(17% - 23%) |
| OS03    | 1        | 18 ± 2     | 18 ± 2           | 4,2                 |                        | Nível 2<br>(6% - 12%)  |
|         | 2        | 19 ± 2     |                  |                     |                        | Nível 4<br>(17% - 23%) |
| OP01    | 1        | 9 ± 1      | 8 ± 2            | 7,6                 |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
|         | 2        | 7,9 ± 0,9  |                  |                     |                        | Nível 5<br>(>24%)      |
| OP02    | 1        | 20 ± 2     | 19 ± 2           | 4,4                 | Nível 2<br>(6% - 12%)  |                        |
|         | 2        | 19 ± 2     |                  |                     | Nível 4<br>(17% - 23%) |                        |
| OP03    | 1        | 24 ± 3     | 25 ± 2           | 2,2                 | Nível 3<br>(13% - 16%) |                        |
|         | 2        | 25 ± 3     |                  |                     | Nível 5<br>(>24%)      |                        |
| FP01    | 1        | 23 ± 3     | 22 ± 2           | 7,7                 | Nível 3<br>(13% - 16%) |                        |
|         | 2        | 21 ± 2     |                  |                     | Nível 3<br>(13% - 16%) |                        |
| FG01    | 1        | 20 ± 2     | 20 ± 2           | 1,9                 | Nível 3<br>(13% - 16%) |                        |
|         | 2        | 20 ± 2     |                  |                     | Nível 3<br>(13% - 16%) |                        |

As amostras PC01, PC02 e PC03 representam óleo de canola puro em diferentes graus de degradação. Analisando a tabela XXI e a figura 13b é possível aferir que o OT funciona de forma adequada com estas amostras, apresentando resultados correlacionáveis com o método oficial e originando cores estáveis e facilmente distinguíveis.



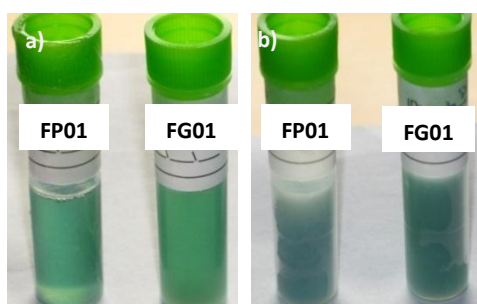
**Figura 13** Fotografias obtida no momento de realização dos testes de a) amostras virgens; b) de diferentes níveis de degradação da amostra PC01; c) de diferentes níveis de degradação da amostra PH01; d) de diferentes níveis de degradação da amostra OS01; e) de diferentes níveis de degradação da amostra OP01.

As amostras PH01, PH02 e PH03 representam óleo de canola hidrogenado em diferentes graus de degradação. Analisando a tabela XXI e a figura 13c é possível verificar que existem alguns problemas associados á utilização do OT com esta amostra, pois parece que o OT está a enviar os resultados, ou seja, apresenta resultados de OT inferiores aos apresentados pelo método oficial. No entanto, é possível verificar que o teste produz cores estáveis e facilmente identificáveis. Em situações destas é importante considerar os erros associados aos métodos utilizados, sendo que as amostras apresentam uma quantidade de compostos polares no limiar dos níveis do OT.

As amostras OS01, OS02 e OS03 representam um óleo que é uma mistura de óleo de girassol, canola e palma em diferentes graus de degradação. Analisando a tabela XXI e a figura 13d é possível aferir que o OT funciona de forma adequada com estas amostras, apresentando resultados correlacionáveis com o método oficial e originando cores estáveis e facilmente distinguíveis.

As amostras OP01, OP02 e OP03 representam um óleo que é uma mistura de óleo de canola e de palma em diferentes graus de degradação. Analisando a tabela XXI e a figura 13 é possível aferir que o OT funciona de forma adequada com estas amostras, apresentando resultados correlacionáveis com o método oficial e originando cores estáveis e facilmente distinguíveis.

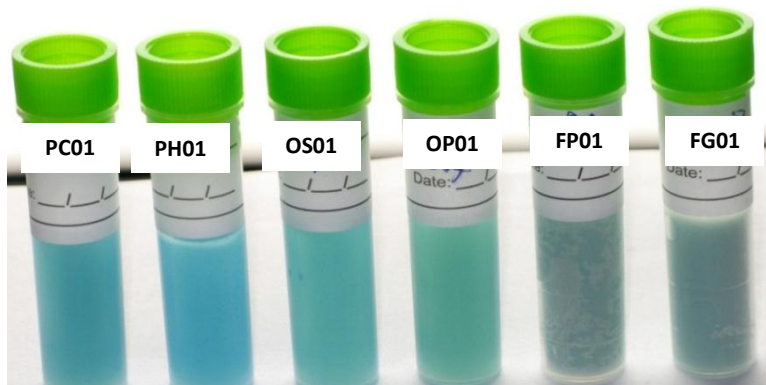
As amostras FP01 e FG01 representam dois tipos de gordura de fritar a banha e a margarina, respetivamente, ambas compostas por óleo de palma. Ambas as gorduras apresentavam-se no estado sólido o que dificultou as análises tanto usando o método oficial como usando o OT. Analisando a tabela XXI pode-se verificar que ambas as gorduras apresentaram valores elevados de compostos polares, apesar de as réplicas serem coerentes estes valores não são confiáveis pois a solidificação destas gorduras era muito rápida corrompendo a análise cromatográfica. Estas análises foram realizadas no Inverno o que pode ter dificultado ainda mais a análise, talvez num ambiente quente fosse possível fazer esta análise de uma forma mais confiável. No entanto, considerando o gasto de recursos e de tempo optou-se por não se repetir esta análise. Sem correlacionar os resultados obtidos com o OT com os oficiais é possível verificar que o OT origina resultados com cores facilmente distinguíveis. No entanto, com a solidificação da amostra a cor apresentada pelo teste é alterada para uma mais opaca e escura tornando apenas possível a leitura dos resultados nos primeiros dez minutos da análise (figura 14). Porém, o reaquecimento do teste faz com que este retome o resultado inicial. Tendo em conta as dificuldades encontradas, não foram estudadas amostras degradadas a partir destas duas amostras já que foi considerado um gasto de recursos desnecessário.



**Figura 14** Fotografias das amostras FG01 e FP01 **a)** no momento do teste; **b)** 15 minutos após realização dos testes.

É usual o OT não alterar a sua resposta durante longos períodos de tempo, e pretendeu-se averiguar se essa estabilidade era também verificada nas amostras de canola e de palma mencionadas. Analisando a figura 15 é possível verificar que os resultados do OT mantêm se estáveis durante pelo menos um mês, com cores facilmente identificáveis para a maioria das amostras. Apenas para as amostras FP01 e FG01 o OT não mantém a mesma resposta, como já

foi verificado antes, no entanto é possível verificar que depois de estabilizada a cor do teste esta mantém-se a mesma durante pelo menos um mês.



**Figura 15** Fotografia obtida um mês depois dos testes terem sido realizados com as amostras virgens.

### 3.3.4.2. *Azeite*

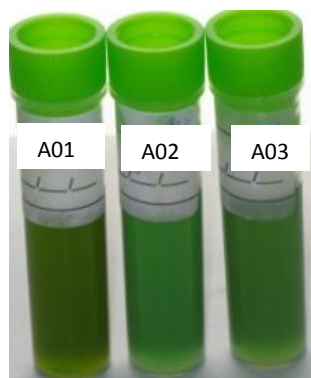
Tendo em conta a crescente aplicabilidade do azeite nos processos de fritura é importante averiguar o comportamento do OT em amostras de azeite, assim foi adquirido um azeite virgem extra de acidez 0,7%. Esta amostra foi degradada originando duas amostras para proporcionar um estudo mais adequado do desempenho do OT. A lista das amostras usadas acompanhadas pelas suas composições e condições estão enumeradas na tabela XI da secção 2.2.1 deste trabalho. Todas as amostras utilizadas foram devidamente caracterizadas em termos de compostos polares através do método oficial ISO 8420:2002 e depois foram analisadas pelo OT, os resultados encontram-se resumidos na tabela XXII e a figura 16 ilustra os resultados obtidos pelo OT para cada amostra.

**Tabela XXII** Percentagem de compostos polares nas amostras de azeite, determinado através do método ISO 8420:2002 (método oficial) e pelo OT.

| Amostra | Réplicas | Método ISO |               |                     | OleoTest®              |                        |                        |
|---------|----------|------------|---------------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|         |          | CPT (%)    | CPT (%) Média | CV <sub>R</sub> (%) | Lote e validade        | Resultado esperado     | Resultado obtido       |
| A01     | 1        | 10 ± 1     | 10,2 ± 0,8    | 3,5                 | OT100605<br>Julho 2013 | Nível 2<br>(6% - 12%)  | Nível 4<br>(17% - 23%) |
|         | 2        | 11 ± 1     |               |                     |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) | Nível 3<br>(13% - 16%) |
| A02     | 1        | 14 ± 2     | 13 ± 1        | 5,4                 |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) | Nível 3<br>(13% - 16%) |
|         | 2        | 13 ± 1     |               |                     |                        | Nível 4<br>(17% - 23%) | Nível 3<br>(13% - 16%) |
| A03     | 1        | 22 ± 3     | 21 ± 2        | 8,7                 |                        | Nível 4<br>(17% - 23%) | Nível 3<br>(13% - 16%) |
|         | 2        | 20 ± 2     |               |                     |                        |                        |                        |

Os resultados obtidos indicam que o OT não apresenta valores em concordância com o método oficial no que respeita a quantificação de compostos polares em amostras de azeite. A tabela XXII e a figura 16 mostram que os resultados não são correlacionáveis com o método oficial mas também que o OT não originou resultados esperados, pois com o aumento de compostos polares a cor tende a ficar mais clara em vez de ficar mais escura. Estes resultados

vão de acordo com resultados obtidos em estudos realizados durante o desenvolvimento do OT (96).



**Figura 16** Fotografia dos testes realizados nas amostras de azeite A01, A02 e A03.

### 3.3.4.3. Óleo de bagaço

Amostras originárias de Espanha de óleo de bagaço foram usadas para avaliar o desempenho do OT, estas amostras apresentavam diferentes níveis de degradação. A lista das amostras usadas acompanhadas pelas suas composições e condições estão enumeradas na tabela XI da secção 2.2.1 deste trabalho.

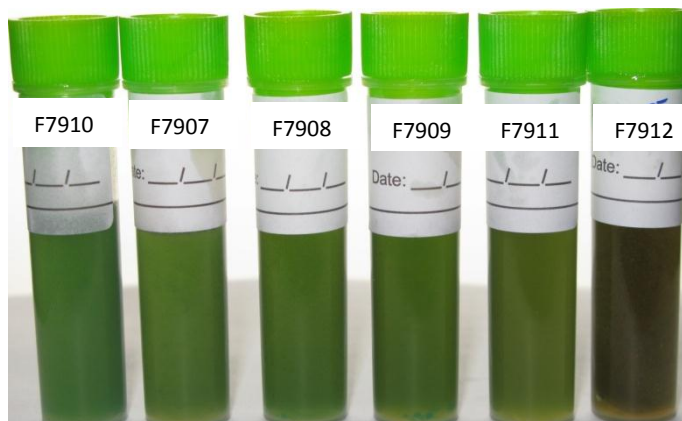
Todas as amostras utilizadas foram devidamente caracterizadas em termos de compostos polares através do método oficial ISO 8420:2002 e depois foram analisadas pelo OT, os resultados encontram-se resumidos na tabela XXIII e a figura 17 ilustra os resultados obtidos pelo OT para cada amostra. Tendo em conta a dimensão reduzida do número de amostras analisadas não se pode tirar conclusões mas apenas ter a perceção do comportamento do OT na análise deste tipo de amostras.

**Tabela XXIII** Percentagem de compostos polares nas amostras de óleo de bagaço, determinado através do método ISO 8420:2002 (método oficial) e pelo OT.

| Amostra | Réplicas | Método ISO |               |                     | OleoTest®              |                        |
|---------|----------|------------|---------------|---------------------|------------------------|------------------------|
|         |          | CPT (%)    | CPT (%) Média | CV <sub>R</sub> (%) | Lote e validade        | Resultado              |
| F7910   | 1        | 13 ± 1     | 13 ± 1        | 0,72                | OT100605<br>Julho 2013 | Nível 3<br>(13% - 16%) |
|         | 2        | 13 ± 1     |               |                     |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
| F7907   | 1        | 14 ± 2     | 13 ± 1        | 3,3                 |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
|         | 2        | 13 ± 1     |               |                     |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
| F7908   | 1        | 14 ± 2     | 14 ± 1        | 1,05                |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
|         | 2        | 14 ± 2     |               |                     |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
| F7909   | 1        | 14 ± 2     | 14 ± 1        | 1,6                 |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
|         | 2        | 15 ± 2     |               |                     |                        | Nível 3<br>(13% - 16%) |
| F7911   | 1        | 16 ± 2     | 16 ± 1        | 0,92                |                        | Nível 4<br>(17% - 23%) |
|         | 2        | 16 ± 2     |               |                     |                        | Nível 4<br>(17% - 23%) |
| F7912   | 1        | 18 ± 2     | 18 ± 1        | 1,9                 |                        | Nível 5<br>(> 24%)     |
|         | 2        | 18 ± 2     |               |                     |                        | Nível 5<br>(> 24%)     |



Analisando a tabela XXIII é possível verificar que os resultados obtidos não são tão bons como o desejável, mas no entanto não descartam completamente a utilização do OT com estes óleos. As amostras F7910, F7907, F7908 e F7909 produzem resultados no OT que são concordantes com os resultados obtidos pelo método ISO, no entanto é visível na figura 17 esta cor representativa do nível 3 é ligeiramente mais escura do que a resposta normal do teste. Este resultado é concordante com o facto do próprio óleo possuir uma cor ligeiramente mais escura do que o óleo alimentar.



**Figura 17** Fotografia tirada aos testes realizados às amostras de óleo de bagaço.

A amostra F7911 foi caracterizada como tendo  $16 \pm 1$  % de CPT pelo método ISO, sendo que esta percentagem de CPT encontra-se no limite do nível 3 com o nível 4. Para essa percentagem de CPT, o OT deveria indicar o nível 4 mas analisando a figura 17 pode-se verificar que a cor do teste para a amostra F7911 é diferente das restantes amostras indicando o nível 4, apesar de não ser uma diferença muito evidente. É necessário ter em conta também os erros associados tanto ao método oficial como ao teste rápido, sendo que em percentagens de CPT no limiar dos níveis do OT esses erros têm maior impacto na interpretação dos resultados.

A amostra F7912 foi a única que não obteve resultados concordantes entre o método ISO e o teste rápido. Pelo método ISO esta amostra continha  $18 \pm 1$  % de CPT correspondendo a um nível 4 do OT, no entanto este teste rápido originou uma resposta consistente com o nível 5 (% CPT > 24%). Este nível do OT indica que o óleo deve ser descartado por estar demasiado degradado pela legislação portuguesa (**114**), no entanto o óleo ainda não atingiu o limite legal de CPT conduzindo a um desperdício pois o óleo não é usado até ao limite. Porém, um descarte antecipado é preferível para o consumidor pois este não é exposto a níveis elevados de CPT, apesar de ser o permitido por lei, funcionando como um descarte por precaução. Esse falso positivo apenas o é tendo em conta a legislação portuguesa, porque se for considerado o

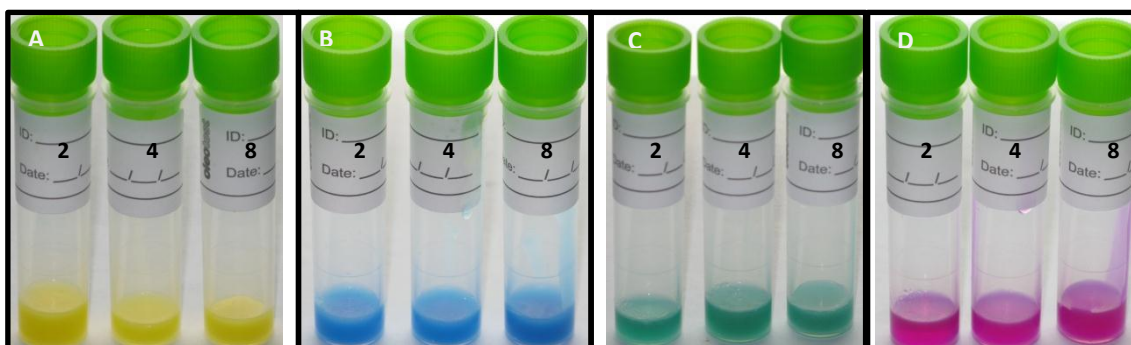
que foi discutido no 6º Simpósio Internacional de Fritura em 2011, um óleo com 19% de CPT já produz alimentos com qualidade muito reduzida **(117)**

Deste modo, é possível concluir que o OT pode ser utilizado para avaliar a percentagem de CPT em óleos de bagaço. Apenas deve ser tida em atenção as cores ligeiramente escurecidas quando comparadas com o comportamento normal do OT e que o ponto de descarte é detetado antes do tempo. Mas uma conclusão rigorosa só poderá ser feita analisando mais amostras, pois com este número de amostras as conclusões não são estatisticamente válidas.

### 3.4. Desenvolvimento de novas formulações de OleoTest®

#### 3.4.1. Estudo das formulações

Apesar de muito promissor ainda há diversas características do OT que podem ser melhoradas, como a obtenção de níveis de cores mais explícitos, menos níveis de cores e a aplicabilidade a outros tipos de óleos ou gorduras de fritar. Deste modo, foram desenvolvidas doze novas formulações que diferiam entre si no composto que dá origem à cor (A, B, C, D) e em outros componentes que modificam a capacidade de solidificação do teste (2, 4, 8), estes testes estão representados na figura 18.



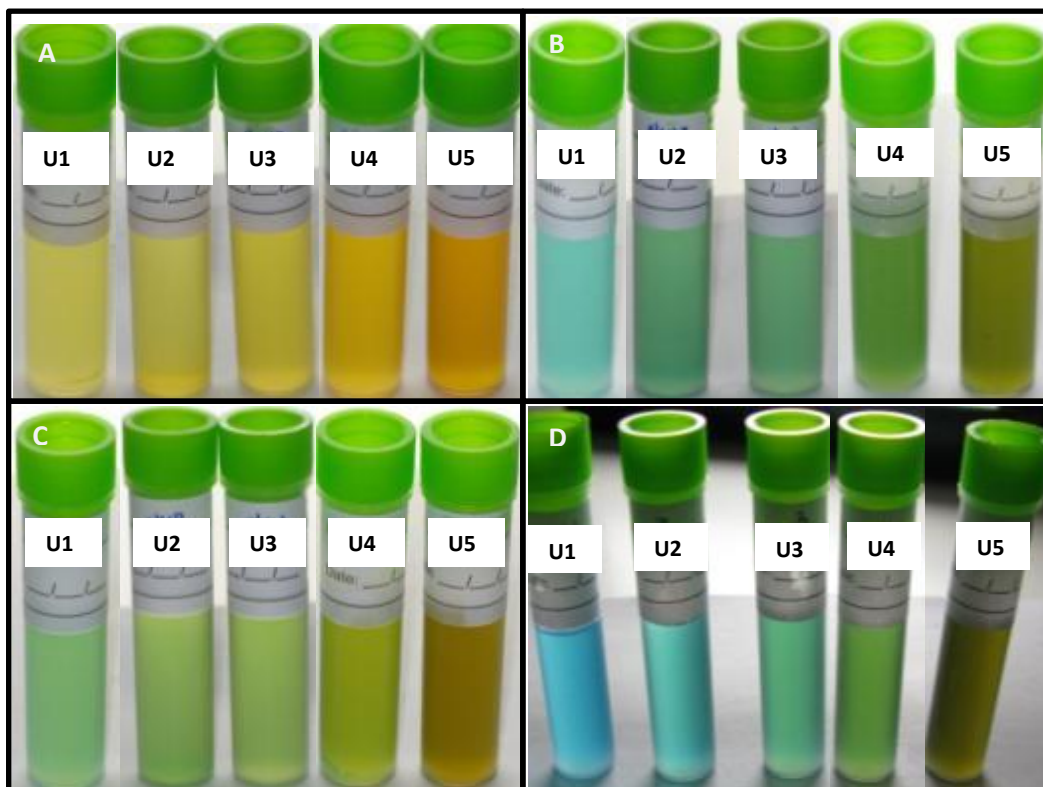
**Figura 18** Fotografias representativas dos testes OT com as novas formulações desenvolvidas, denominadas de A2, A4, A8, B2, B4, B8, C2, C4, C8, D2, D4 e D8.

Cada formulação foi testada de modo a avaliar o seu comportamento em termos de solidificação e cor originada com amostras de óleo alimentar de diferentes níveis de CPT. Inicialmente foram usadas as formulações para analisar três amostras com diferentes percentagens de CPT, U1 com  $5,5 \pm 0,5$  % de CPT, U4 com  $21 \pm 2$  % de CPT e a U5 com  $33 \pm 3$  % de CPT. Verificou-se que as formulas A2, B2, C2 e D2 possuem um tempo de solidificação muito alargado levando a que a amostra não permaneça dissolvida no reagente o que faz com que a resposta do teste só possa ser avaliada no momento de realização do mesmo. Foi também visível que as formulações A8, B8, C8 e D8 tinham um comportamento contrário, ou seja, o tempo de solidificação era muito curto, sendo necessárias elevadas temperaturas para

que o reagente se dissolvesse na amostra. A posterior solidificação acontecia demasiado rápido o que por vezes impedia a total dissolução do reagente na amostra. Em termos de solidificação, as formulações A4, B4, C4 e D4 pareceram as mais promissoras por possuírem um tempo de solidificação que permitia a correta dissolução do reagente na amostra e sua posterior solidificação com a resposta do teste intacta.

A análise das três amostras referidas (U1, U4 e U5) permitiu também avaliar as cores geradas por cada formulação de modo a verificar se todas as formulações conseguiam indicar um ponto de descarte do óleo de fritar dentro dos limites estabelecidos. Deste modo verificou-se que as formulações A4, A8, B2, B4, B8, C2 e C4 eram as que faziam a distinção entre os diferentes níveis de CPT de forma mais intensa. As formulações A2, C2, D2, D4 e D8 não distinguiram nenhum nível de cor de forma intensa nem apresentava melhoria em relação à formulação de OT já usada.

Assim, tendo em conta os indícios da primeira etapa dos estudos apenas as formulações A4, B4 e C4 foram usadas para avaliar mais duas amostras de forma a poder comparar as respostas destas com as respostas do OT original em todos os níveis de CPT. Assim, para além das três amostras já mencionadas foram usadas a amostra U2 com  $7,7 \pm 0,6$  % de CPT e a amostra U3 com  $13 \pm 1$  % de CPT. A figura 19 mostra os resultados obtidos para as cinco amostras usando as três formulações novas e o OT original.

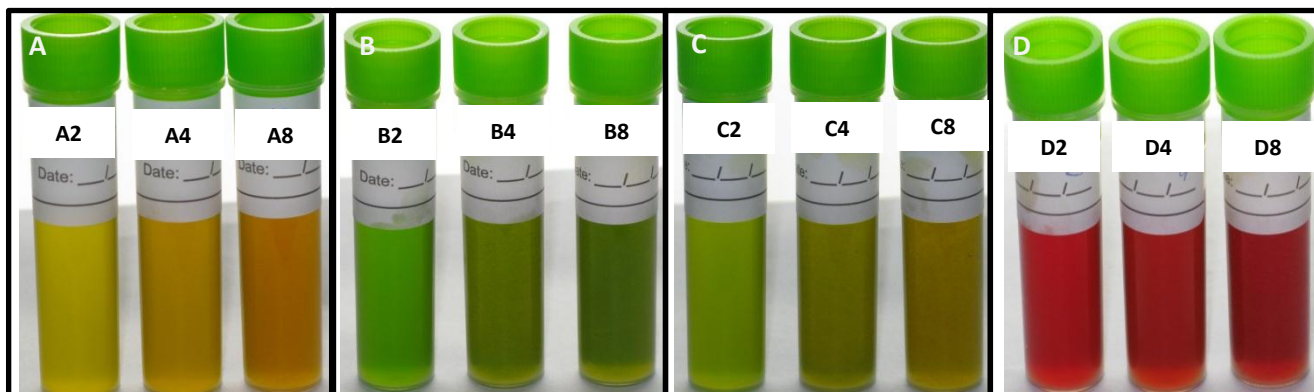


**Figura 19** Fotografias obtidas aos testes das diferentes formulações realizados para analisar cinco amostras: A) A4; B) B4; C) C4 e D) OT.

Comparando os resultados obtidos com as três formulações novas, para análise das cinco amostras, com os resultados obtidos pelo OT verifica-se que nenhuma das formulações é vantajosa, pois as cores não são mais intensas nem permitem uma melhor distinção dos níveis de CPT. Por outro lado, a formulação A4, principalmente, mas também a C4 parecem manter uma progressão de cores muito lenta podendo ter uma boa aplicação como teste de duas cores permitindo ao utilizador apenas avaliar quando o óleo está no nível de descarte.

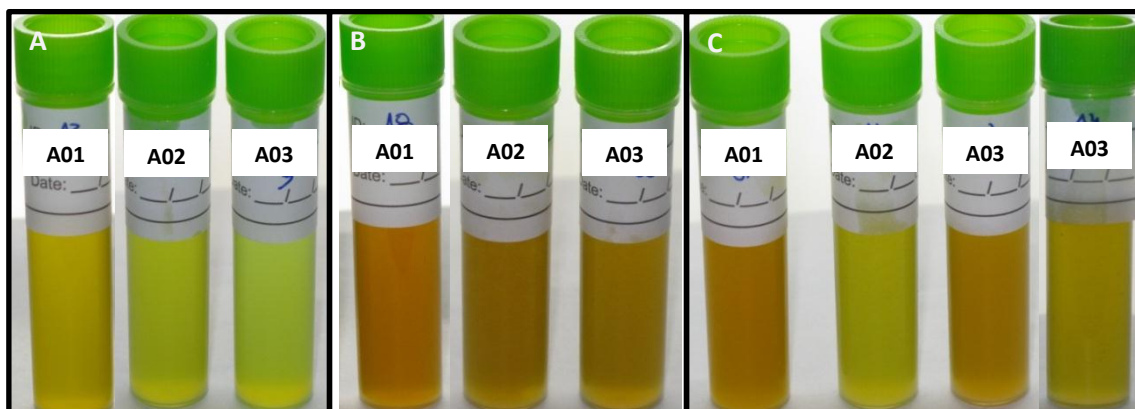
### 3.4.2. Aplicação das formulações em amostras de azeite

Como já verificado no capítulo 3.3.5.2, o OT não permite uma análise correta de amostras de azeite, por isso era interessante analisar as amostras de azeite com as novas formulações desenvolvidas. Dessa forma, a figura 20 mostra os resultados obtidos pelas formulações A's, B's, C's e D's na análise da amostra A01, azeite virgem. Este passo foi realizado para verificar quais as formulações mais promissoras na análise de azeites. A quantificação das amostras usadas nesta parte da experiência em termos de compostos polares pelo método ISO está apresentada na tabela XXII.



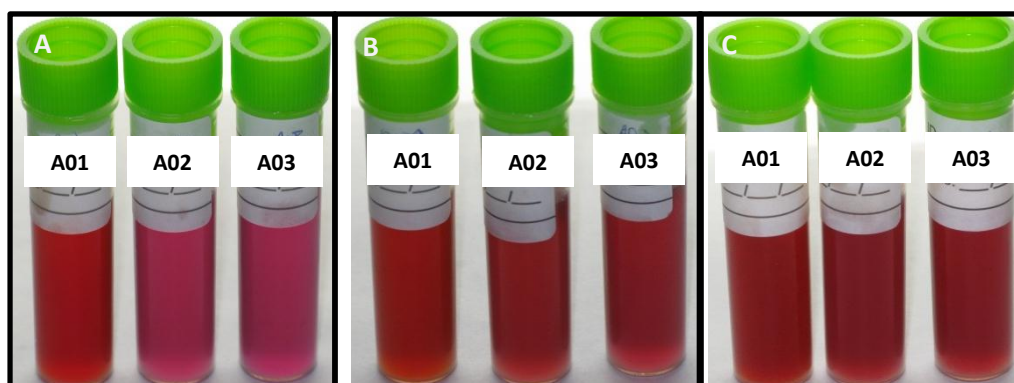
**Figura 20** Fotografias dos testes realizados para analisar azeite virgem com as diferentes formulações desenvolvidas (da esquerda para a direita): A) A2, A4 e A8; B) B2, B4 e B8; C) C2, C4 e C8; D) D2, D4 e D8.

Analisando os resultados verificou-se que todas as fórmulas geravam cores muito intensas logo desde o início o que poderia dificultar a distinção dos restantes níveis de cores. Pela análise da figura 20 considerou-se mais promissoras as formulações A (pelas diferenças de cor) e D (pelos tons rosa serem considerados vantajosos na análise do azeite) **(96)**. Por isso analisou-se duas amostras de azeite degradadas com as formulações A's e D's, mas também com as formulações B4 e C4 por curiosidade.



**Figura 21** Fotografias dos testes realizados para analisar três amostras de azeite em diferentes níveis de degradação, com as formulações: A) A2; B) A8 e C) A4.

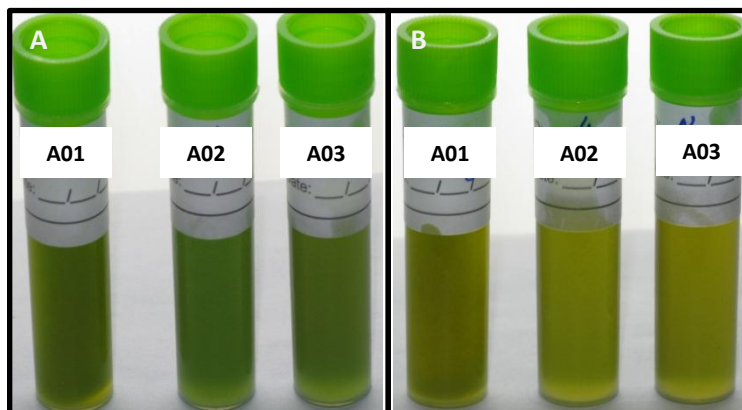
A figura 21 mostra os resultados obtidos pelas formulações A's na análise das amostras A01, A02 e A03. Analisando os resultados é possível verificar que tanto a formulação A2 como a formulação A8 não produzem resultados satisfatórios, por não distinguirem os níveis de percentagem de CPT das diferentes amostras. A formulação A4 produz resultados um pouco peculiares, analisando a figura 21c pode-se verificar que para a mesma amostra o teste origina dois resultados diferentes. A amostra foi analisada por quatro testes independentes da mesma formulação onde dois deles davam a primeira cor e outros dois originavam a segunda cor. Estes resultados indicam que talvez aquela amostra se encontre numa situação limite de percentagem de CPT detetada por esta formulação. Isto pode significar que esta formulação possa ser usada para determinar o ponto de descarte de amostras de azeite entre os 21% e os 22% de CPT, pois as cores geradas são facilmente distinguíveis. O problema que se encontra nesta formulação é que a resposta gerada para amostras degradadas é semelhante à reposta obtida para amostras virgens, podendo levantar algumas incertezas. É necessário ter em atenção que estes são apenas resultados preliminares pois a dimensão da amostra é muito pequena para que o estudo possa ser considerado conclusivo.



**Figura 22** Fotografias dos testes realizados para analisar três amostras de azeite em diferentes níveis de degradação com diferentes formulações: A) D2; B) D4 e C) D8.

As amostras de azeite foram também analisadas pelas formulações D's, mas como é visível na figura 22 os resultados não foram satisfatórios. Em todas as formulações D's as cores originadas foram muito fortes e não permitiram a distinção dos diferentes níveis de CPT, não apresentando por isso melhorias em relação á formulação de OT original na análise de azeites.

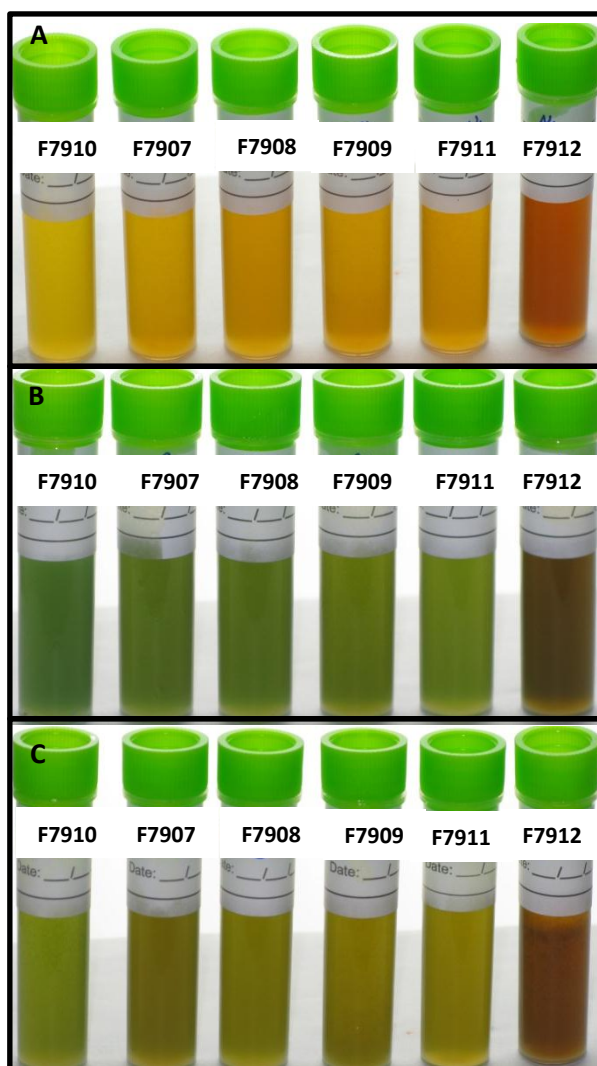
As formulações B4 e C4 foram usadas para analisar as amostras de azeites apenas para confirmar se realmente não eram capazes de realizar uma análise fidedigna. Na figura 23a pode-se verificar que o comportamento da formulação B4 é muito semelhante ao do OT original (figura 16) não trazendo por isso nenhuma vantagem. Por outro lado, pode-se verificar que a formulação C4 (figura 16b) possui cores muito semelhantes entre si com uma certa tendência de cores esperada. Este resultado pode indicar que poderá haver uma distinção de cores a níveis mais elevados de CPT, apesar de pouco provável e não ideal pois a amostra A03 já possui  $21 \pm 2 \%$  de CPT podendo significar que esta formulação apenas distingue a níveis de CPT superiores ao limite estabelecido legalmente **(114)**.



**Figura 23** Fotografias dos testes realizados para analisar três amostras de azeite em diferentes níveis de degradação com as formulações: A) B4 e B) C4.

### 3.4.3. Aplicação das formulações em amostras de óleo de bagaço

Na secção 3.3.5.3 verificou-se que o OT apesar de permitir a análise de amostras de óleo de bagaço, este não possui o comportamento ideal indicando o descarte antes do limite estabelecido **(114)**. Tendo isso em conta, foram usadas as formulações A4, B4 e D4 para analisar as amostras de óleo de bagaço já referidas (F7907, F7908, F7909, F7910, F7911 e F7912) de modo a verificar se algumas destas formulações acarretam vantagens em relação ao OT original.



**Figura 24** Fotografias dos testes realizados para analisar seis amostras de óleo de bagaço em diferentes níveis de degradação com as formulações: A) A4; B) B4 e C) C4.

Analisando os resultados obtidos pelas diversas formulações, apresentados na figura 24, é possível verificar que nenhuma das novas formulações traz vantagens em relação ao OT original, pois os resultados obtidos são semelhantes entre as diversas formulações e ao OT original. Estes resultados indicam que o mais vantajoso é manter a formulação original para analisar óleos de bagaço com um ajuste na escala de cores utilizada para avaliar a resposta.

• • •

# Conclusão

• • •





## 4. Conclusão

O método ISO 8420:2002 é um método de quantificação de CPT internacionalmente reconhecido, constantemente validado e melhorado **(95)**. No entanto, como verificado neste trabalho este método é dispendioso, demorado (ver Anexo), sensível ao operador e difícil de validar intralaboratorialmente. Para substituir a necessidade do método oficial um teste rápido deve oferecer resultados fiáveis e superar os principais problemas do método oficial. Os resultados deste trabalho permitiram verificar que há correlação entre os resultados do método oficial e os do teste rápido OleoTest®. Este teste é económico, rápido e simples, para além de apresentar uma resposta estável que permite o seu armazenamento funcionando como comprovativo de que a qualidade do óleo de fritar está a ser controlada.

O OT está extensamente validado para avaliar a quantidade de CPT em óleos alimentares, óleos de amendoim, óleos de milho, óleos de soja, entre outros, no entanto ainda existem muitos óleos cujo comportamento do OT não é conhecido. Os estudos preliminares realizados neste trabalho demonstraram que o OT poderá determinar corretamente a quantidade de CPT em óleos de bagaço e óleos de canola. Estes resultados promissores permitiram abrir portas para o mercado internacional, como Espanha e Polónia, havendo assim uma maior divulgação do produto. No entanto, estudos adicionais são necessários para uma validação mais rigorosa sobre a análise destes tipos de óleos pelo OT.

O OT constitui um teste rápido muito promissor para quantificação de CPT em óleos de fritar usados, no entanto ainda não é utilizável com todos os tipos de gorduras ou óleos de fritar. O azeite é uma gordura muito utilizada para fritar em alguns países, no entanto esta gordura altera o comportamento do OT não sendo adequada a análise utilizando este teste. A necessidade de superar este problema acoplado com outras necessidades, como diminuir os níveis de resposta do OT e tornar as respostas mais perceptíveis, levaram ao desenvolvimento de novas formulações que foram avaliadas neste trabalho. Apesar de resultados preliminares promissores verificou-se que ainda nenhuma das formulações reunia as características desejadas para substituir o OT de forma vantajosa.

Para além de todas as vantagens do OT analisadas ao longo deste trabalho, o problema principal deste teste consiste na sua subjetividade estando dependente da interpretação do operador. Numa tentativa de superar este problema ao longo deste ano foi estudada uma forma de avaliar a resposta do teste através de um programa informático de tratamento de imagem simples e rápido. Para esse efeito foi otimizado um método fotográfico de modo a captar a resposta do OT perdendo o mínimo de cor, permitindo uma avaliação fiável. O segundo passo seria desenvolver o programa informático que determinaria o código RGB do teste realizado e compararia com o código RGB de cada nível do OT indicando a percentagem

de proximidade da cor do teste realizado com o nível mais adequado. No entanto, o desenvolvimento deste programa necessitava do apoio de pessoal especializado.

O projeto OT é muito promissor e aliciente sendo que ainda há muito para ser estudado e melhorado. Numa próxima etapa seria interessante direcionar os estudos para o desenvolvimento de amostras padrão de CPT para que a validação do OT possa ser realizada de forma rápida e fiável, facilitando também a avaliação do desempenho de novas formulações. Este estudo poderia ser direcionado para a avaliação da utilização de monoestearina como padrão interno em amostras de óleo de fritar. Outro passo importante será a validação do OT em ensaios interlaboratoriais transmitindo maior fiabilidade dos resultados obtidos pelo teste. Estes ensaios são difíceis de organizar exigindo disponibilidade de outros laboratórios e custos associados por vezes demasiado elevados. Algumas empresas foram contactadas de modo a se conseguir organizar um ensaio interlaboratorial, no entanto poucas empresas se disponibilizaram ou então solicitaram valores elevados, não permitindo a execução do ensaio durante a realização deste trabalho. Para além destes estudos, é também importante desenvolver um programa informático que permite a avaliação da resposta do OT objetivamente conferindo assim respostas mais confiáveis. Da mesma forma é importante também o contínuo estudo para melhorar a formulação de OT de modo que este possa ser utilizado em todos os óleos ou gorduras de fritar.

A execução deste trabalho em âmbito empresarial acoplado com a conjuntura nacional e internacional exigiu um controlo rigoroso de gastos e uma utilização eficiente de tempo e recursos disponíveis. Apesar de algumas dificuldades, o trabalho realizado foi muito aliciente e os resultados foram extremamente importantes para o melhoramento e internacionalização do OT.

• • •

# Referências

• • •



## 5. Referências

1. Choe E, Min DB. Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. *J Food Sci* 2007;72(5):R77-R86.
2. Bansal G, Zhou W, Barlow PJ, Joshi PS, Lo HL, Chung YK. Review of Rapid Tests Available for Measuring the Quality Changes in Frying Oils and Comparison with Standard Methods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010;50(6):503-14.
3. Dobarganes C, Márquez-Ruiz G, Velasco J. Interactions between fat and food during deep-frying. *Eur J Lipid Sci Tech*. 2000;102(8-9):521-8.
4. Pedreschi F, Moyano P, Kaack K, Granby K. Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Res Int*. 2005;31:1-9.
5. Osawa CC, Gonçalves LAG, Mendes FM. Avaliação dos óleos e gorduras de fritura de estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas/SP. As boas práticas de fritura estão sendo atendidas? . *Alimentos e Nutrição* 2010;21(1):47-55.
6. Aladedunye F, Przybylski R. Frying Performance of Canola Oil Triacylglycerides as Affected by Vegetable Oils Minor Components. *J Am Oil Chem Soc*. 2011:1-13.
7. Marmesat S, Rodrigues E, Velasco J, Dobarganes C. Quality of used frying fats and oils: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties. *Int J Food Sci Nutr* 2007;42:601-8.
8. Dobarganes MC, Márquez Ruiz G. Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. *Grasas Aceites*. 1998;49 (3-4):331-5.
9. Aladedunye F, Przybylski R. Rapid Assessment of Frying Performance Using Small Size Samples of Oils/Fats. *J Am Oil Chem Soc*. 2011:1-7.
10. Lehninger A, Nelson D, Cox M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed: W. H. Freeman; 2008.
11. Enig MG. *Know your fats: the complete primer for understanding the nutrition of fats, oils and cholesterol*. Maryland: Silver Spring; 2000.
12. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Principles of biochemistry*. New Jersey: John Wiley & sons; 2007.
13. Watkins BA, Li Y, Hennig B, Toborek M. Dietary Lipids and Health. In: Shahidi F, editor. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
14. Presidência do Conselho de Ministros e Ministérios da Economia, da Agricultura, do Desenvolvimento rural e das pescas e da saúde (Portugal), Portaria n.º 928/98, (1998).
15. Gunstone FD. Vegetable Oils. In: Shahidi F, editor. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
16. Casal S, Malheiro R, Sendas A, Oliveira BPP, Pereira JA. Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(10):2972-9.

17. Foster R, Williamson CS, Lunn J. Briefing paper: Culinary oils and their health effects. *Nutrition Bulletin*. 2009;34(1):4-47.
18. Sanders T. Essential fatty acid. In: Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ, editors. *Encyclopaedia of food science food technology and nutrition*. New York: Academic Press Limited; 1993. p. 1651-4.
19. Kamm W, Dionisi F, Hischenhuber C, Engel K-H. Authenticity assessment of fats and oils. *Food Rev Int*. 2001;17(3):249-90.
20. Brinkmann B. Quality criteria of industrial frying oils and fats. *Eur J Lipid Sci Tech*. 2000;102(8-9):539-41.
21. FAO. Codex Standard for named vegetable oils. *Codex Alimentarius* 2001. p. 11 - 25.
22. Presidência da Conselho de Ministros e Ministérios da Economia, da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas e da Saúde (Portugal), Portaria nº 928/98, (1998).
23. Stewart C. Authenticity of Edible Oils and Fats: The Legal Position. In: Jee M, editor. *Oils and fats authentication*. Northwest: Blackwell Publishing Lda; 2002. p. 181- 205.
24. Aparicio R, Harwood J. *Manual del aceite de Oliva*. Madrid: Mundiprensa; 2003.
25. Przybylski R, Mag T, Eskin NAM, McDonald BE. Canola Oil. In: Shahidi F, editor. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
26. Basiron Y. Palm Oil. In: Shahidi F, editor. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
27. Romani A, Lapucci C, Cantini C, Ieri F, Mulinacci N, Visioli F. Evolution of Minor Polar Compounds and Antioxidant Capacity during Storage of Bottled Extra Virgin Olive Oil. *J Agr Food Chem*. 2007;55(4):1315-20.
28. Olive oil. In: Boskou D, editor. *Chemistry and Technology*. 2nd ed: AOCS Press; 2006.
29. Stevenson SG, Vaisey-Genser M, Eskin N. Quality control in the use of deep frying oils. *J Am Oil Chem Soc*. 1984;61:1102-8.
30. Sahin S, Sumnu SG, editors. *Advances in deep-fat frying of food*. New York: CRC Press; 2009.
31. Fritsch C. Measurements of frying fat deterioration: A brief review. *J Am Oil Chem Soc*. 1981;58(3):272-4.
32. Chang SS, Peterson RJ, Ho CT. Chemical reactions involved in deep-fat frying of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1978;55:718-724.
33. Ouchon PB, Aguilera JM, Pyle DL. Structure Oil-Absorption Relationships During Deep-Fat Frying. *J Food Sci*. 2003;68(9):2711-6.
34. Fillion L, Henry CJK. Nutrient losses and gain during frying. *J Food Sci*. 1998;49:157-66.

35. Morton ID, Chidley JE. Methods and equipment in frying. In: Varela G, Bender AE, Morton ID, editors. *Frying of food Principles, changes and new approaches*. Chichester: Ellis Horwood; 1988. p. 37-51.
36. Moreno C, Ouchon PB. Effect of freeze, air and osmotic drying on tissue composition. oil absorption and location during potato frying. *J Food Sci*. 2008;43:122-8.
37. Saguy IS, Dana D. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *J Food Eng*. 2003;56(2-3):143-52.
38. Paul S, Mittal GS. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1997;37(7):635-62.
39. Kleinova A, Cvangrosova Z, Mikulec J, Cvangros J. Properties of Fatty Acids Methyl Esters from Used Frying Oils. *Chem Engineer Trans*. 2010;21:667-72.
40. Chung J, Lee J, Choe E. Oxidative stability of soybean and sesame oil mixture during frying of flour dough. *J Food Sci*. 2004;69:574-8.
41. Houhoula DP, Oreopoulou V, Tzia C. The effect of process time and temperature on the accumulation of polar compounds in cottonseed oil during deep-fat frying. *J Sci Food Agric*. 2003;83(4):314-9.
42. Gertz C, Klostermann S, Kochhar SP. Testing and comparing oxidation stability of vegetable oils and fats at frying temperature. *Eur J Lipid Sci Tech*. 2000;102:543-51.
43. Dobarganes MC, Marmesat S, Morales A, Velasco J. Action and fate of natural and synthetic antioxidants during frying. *Grasas Aceites*. 2010;61(4):333-40.
44. Frankel EN. *Lipid Oxidation*. California: The Oil Press 2005.
45. Romero A, Cuesta C, Sánchez-Muniz FJ. Trans fatty acid production in deep fat frying of frozen foods with different oils and frying modalities. *Nutr Res*. 2000;20(4):599-608.
46. Gamel TH, Kiristsakis A, Petrakis C. *Effect of phenolic extracts on trans fatty acid formation during frying*. Sevilla: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de la Grasa; 1999.
47. Sébédio JL, Dobarganes MC, Márquez G, Wester I, Christie WW, Dobson G, et al. Industrial production of crisps and prefried French fries using sunflower oils. *Grasas Aceites*. [Crisps; French fries; High oleic sunflower oil; Industrial frying; Mixtures of vegetable oils; Palm olein Sunflower oil;]. 1996;47(1-2):5-13.
48. Sanibal EAA, Mancini Filho J. Perfil de ácidos graxos trans de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2004;24:27-31.
49. Christie WW, Dobson G. Formation of cyclic fatty acids during the frying process. *Eur J Lipid Sci Tech*. 2000;102(8-9):515-20.



50. Blumenthal MM. A new look at the chemistry and physics of deep-fat frying. *Food Technol.* 1991;2:68-71.
51. Gertz C. Chemical and physical parameters as quality indicators of used frying fats. *Eur J Lipid Sci Tech.* 2000;102(8-9):566-72.
52. DGF. Recommendations for frying oils. 3rd Internacional symposium on deep-fat frying. *Eur J Lipid Sci Tech.* 2000;102:594.
53. Frayn K, Stanner S. The aetiology and epidemiology of cardiovascular disease. In: Stanner S, editor. *Cardiovascular Disease: Diet, Nutrition and Emerging Risk Factors (The Report of the British Nutrition Foundation Task Force)*. Oxford: Blackwell; 2005. p. 1-21.
54. Lunn J. Monounsaturates in the diet. *Nutrition Bulletin.* 2007;32(4):378-91.
55. Bermudez MGM, Sinclair AJ. Fatty Acids and Obesity. *Curr Pharm Design.* 2009;15:4117-25.
56. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the third National Health Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension.* 1995;25:305-19.
57. Soriguer F, Rojo-Martínez G, Dobarganes MC, García Almeida JM, Esteva I, Beltrán M, et al. Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(6):1092-7.
58. Yen P-L, Chen B-H, Yang FL, Lu Y-F. Effects of deep-frying oil on blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Nutrition.* 2010;26(3):331-6.
59. Khan-Merchant N, Penumetcha M, Meilhac O, Parthasarathy S. Oxidized Fatty Acids Promote Atherosclerosis Only in the Presence of Dietary Cholesterol in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. *J Nutr.* 2002;132(11):3256-62.
60. Chiang TA, Wu PF, Ko WC. Identification of carcinogens in cooking oil fumes. *Environ Res.* 1999;81:18-22.
61. Chiang TA, Wu PF, Wang LF, Li H, Li CH, Ko YC. Mutagenicity and polycyclic hydrocarbon content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Mutat Res-Fund Mol M* 1997;381:157-61.
62. Qu YH, Xu GX, Zhou JZ, Chen TD, Zhu LF, Shields P. G., et al. Genotoxicity of heated cooking oil vapors. *Mutat Res.* 1992;298:105-11.
63. Ko YC, Cheng LS, Lee CH. Chinese food cooking and lung cancer in women nonsmokers. *Am J Epidemiol.* 2000;151:140-7.
64. Yu IT, Chiu YL, Au JS. Dose-response relationship between cooking fumes exposures and lung cancer among Chinese nonsmoking women. *Cancer Res.* 2006;66:4961-7.

65. Svendsen K, Sjaastad AK, Sivertsen I. Respiratory symptoms in kitchen workers. *Am J Ind Med.* 2003;43:436-9.
66. Chang LW, Lo WS, Lin P. Trans,trans-2,4-decadienal, a product found in cooking oil fumes, induces cell proliferation and cytokine production due to reactive oxygen species in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Sci.* 2005;87:337-43.
67. Young S-C, Chang LW, Lee H-L, Tsai L-H, Liu Y-C, Lin P. DNA damages induced by trans,trans-2,4-decadienal (tt-DDE), a component of cooking oil fume, in human bronchial epithelial cells. *Environ Mol Mutagen.* 2010;51(4):315-21.
68. Freire DBP. *Controlo de qualidade de óleos vegetais comercializados na região do grande Porto.* Porto: Universidade do Porto; 2002.
69. Abdulkarim SM, Long K, Lai OM, Muhammad SKS, Ghazali HM. Frying quality and stability of high-oleic Moringa oleifera seed oil in comparison with other vegetable oils. *Food Chem.* 2007;105(4):1382-9.
70. Stier RF. Frying as a science – An introduction. *Eur J Lipid Sci Tech.* 2004;106(11):715-21.
71. Kim IH, Kim CJ, Kim HD. Physicochemical properties of methyl linoleate oxidized at various temperatures *Korean J Food Sci Tech.* 1999;31:600-5.
72. Clark WL, Serbia GW. Safety aspects of frying fats and oils. *Food Technol.* 1991;45:84-93.
73. Xu X-Q, Tran V, Palmer M, White K, Salisbury P. Chemical and physical analyses and sensory evaluation of six deep-frying oils. *J Am Oil Chem Soc.* 1999;76(9):1091-9.
74. Warner K, Mounts TL. Frying stability of soybean and canola oils with modified fatty acid compositions. *J Am Oil Chem Soc.* 1993;70:983-91.
75. Warner K, Knowlton S. Frying quality and oxidative stability of high-oleic corn oils. *J Am Oil Chem Soc.* 1997;74:1317-22.
76. Kochhar SP, Gertz C. New theoretical and practical aspects of the frying process. *Eur J Lipid Sci Tech.* 2004;106:722-9.
77. Artz WE, Osidacz PC, Coscione AR. Acceleration of the thermooxidation of oil by heme iron. *J Am Oil Chem Soc.* 2005;82:579-84.
78. Negishi H, Nishida M, Endo Y, Fujimoto K. Effect of a modified deep-fat fryer on chemical and physical characteristics of frying oil. *J Am Oil Chem Soc.* 2003;80:163-9.
79. Stier RF. Tests to monitor quality of deep-frying fats and oils. *Eur J Lipid Sci Tech.* 2004;106(11):766-71.
80. Bobbio PA, Bobbio FO. *Química do Processamento de Alimentos.* 3rd ed. São Paulo: Varela; 2001.

81. Xu X-Q. A chromametric method for the rapid assessment of deep frying oil quality. *J Sci Food Agric*. 2003;83(13):1293-6.
82. Xu XQ. A new spectrophotometric method for the rapid assessment of deep frying oil quality. *J Am Oil Chem Soc*. 2000;77:1083-6.
83. Li Y, Ngadi M, Oluka S. Quality changes in mixtures of hydrogenated and non-hydrogenated oils during frying. *J Sci Food Agric*. 2008;88(9):1518-23.
84. El-Shami SM, Selim IZ, El-Anwar IM, El-Mallah MH. Dielectric properties for monitoring the quality of heated oils. *J Am Oil Chem Soc*. 1992;69(9):872-5.
85. Onwumere FC, A. PR, Troung JG, inventors; 3M Innovative Properties Company, assignee. Methods and devices for measuring total polar compounds in degrading oils. U.S.A, 2002.
86. Tseng Y-C, Moreira RG, Sun X. Total frying-use time effects on soybean oil deterioration and on tortilla chip quality. *Int J Food Sci Tech*. 1996;31:287-94.
87. Blumenthal D. The chemistry and technology of deep-fat frying. *Food Technol*. 1991;45:68-71.
88. Mariod A, Matthäus B, Eichner K, Hussein I. Frying quality and oxidative stability of two unconventional oils. *J Am Oil Chem Soc*. 2006;83(6):529-38.
89. Márquez-Ruiz G. Determination of Polar Compounds in Used Frying Oils and Fats by Adsorption Chromatography. 2009.
90. Márquez-Ruiz G. Analysis of Used Frying Oils and Fats by High-Performance Size-Exclusion Chromatography. 2011.
91. Dobarganes C, Márquez-Ruiz G. Formation and analysis of oxidized monomeric, dimeric and higher oligomeric triglycerides. In: Erickson MD, editor. *Deep Frying: Chemistry, Nutrition and Practical Applications* Champaign: AOCS Press; 2007.
92. Lopes MRV, Jorge N. Testes rápidos utilizados na avaliação da qualidade de óleos e gorduras de fritura. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 2004;1(63):73-9.
93. DGF - Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e. V. [atualizado Junho 2012]; Available from: <http://www.dgfett.de>.
94. ISO. 8420:2002 Animal and Vegetable fats and oils - Determination of content of polar compounds. 2002.
95. Dobarganes C, Velasco J, Dieffenbacher A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl Chem*. 2000;72(8):1563-75.
96. Castro, Pinto & Costa. Projecto OLEOTEST, Projecto IDEIA (I&D Empresarial Aplicado). Financiado pela Agência de Inovação. 2004.

97. Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios (2004).
98. Vaz A, Moreira R, Hogg T. Introdução ao HACCP. Porto: Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica (AESBUC) no âmbito do Projecto Interactive Training for the Agro-Food Industry (projecto nº: P/96/2/0099/PI/II.1.1.a/FPC);, 2000.
99. Machado J. Análise do cumprimento dos programas de pré-requisitos para a implementação do sistema HACCP em empresas do sector de panificação e do canal horeca. Ponte de lima: Instituto Politécnico de Viana do Castelo 2011.
100. Márquez-Ruiz G, Jorge N, Martín-Polvillo M, Dobarganes MC. Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. *J Chromatogr A*. 1996;749(1-2):55-60.
101. Zhou WB, Bonsai G, Barlow PJ, Joshi P, Neo FL, Lo HL. Evaluation of commercially available rapid test kits for the determination of oil quality in deep-frying operations. *Food Chem*. 2010;121(2):621-6.
102. Fox R. Frying oils. In: Goodburn K, editor. *EU Food Law: A practical guide*. Boca Raton: CRC; 2001. p. 210-20.
103. Firestone D. Regulation of frying fat and oil. In: Erickson MD, editor. *Deep frying: Chemistry, Nutrition and Practical Applications* 2nd ed. Champaign: AOCS Press; 2007. p. 373-85.
104. Gertz C. Deep frying remains an art. *Eur J Lipid Sci Tech*. 2004;106(11):713-4.
105. Berechnung des Eugehaltes von Lebensmitteln aus dem cholesteringehalt (2006/11). *Journal für verbramcher schutz uncl lebensmittel sicherhert*. 2006;371.
106. Firestone D, Stier RF, Blumenthal MM. Regulation of frying fats and oils. *Food Technol*. 1991;45(2):90-4.
107. *Codex Alimentarius Austriacus (Österreichisches Lebensmittelbuch)*, (1911).
108. *Royal Decree*, (1988).
109. *Instrução Normativa n.º49, de 22 de Dezembro de 2006*, (2006).
110. Central R. Federal/Provincial/Territorial Committee on Food Safety Policy (FPTCFSP) *Guidelines on Deep Fryers and Frying Oil*. 2010.
111. Stier RF. *Ensuring the Safety and Quality of Fried Foods 2007* [cited 2012]; Available from: <http://www.foodsafetymagazine.com/article.asp?id=1969>.
112. *Warenwatbesluit bereiding en behandeling van levensmittlelen*, (1992).

113. Az élelmiszerek vegyi szennyezettségének megengedhető mértékéről. Magyar Közlöny Lap- és Könyvkiadó. 1999.
114. Ministérios da Agricultura, da Saúde e do Ambiente e recursos naturais (Portugal), Portaria n.º 1135/95, (1995).
115. Ordonnance du DFI sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires, (1995).
116. Huber L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Second ed. New York: Informa Healthcare; 2007.
117. DGF. Errors and Myths of Industrial and Catering Frying. 6th International Symposium on Deep-Frying. Hagen, Germany 2011; Available from: <http://www.dgfett.de/material/recomm.php>.

• • •

# Anexos

• • •



## Anexos

### Metodologia oficial versus OleoTest®: Custos e Tempo

Na tabela AI podem ser encontrados os custos associados à implementação do método ISO 8420:2002 para o controlo de qualidade de óleos de fritar bem como os custos associados por análise.

**Tabela AI** Custo associado ao método ISO 8420:2002, tendo em conta a sua implementação, custo por cada análise, considerando que em cada análise são realizadas duas réplicas, e o custo de reposição do *stock*.

| Material, reagentes e equipamento | Unidades por encomenda | Preço por encomenda (€) | Quantidade gasta por análise | Custo por análise (€) | Custo por reposição de <i>stock</i> (€) |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|---|
| Balança analítica                 | 1                      | 6 150,00                | 1                            | -                     | -                                       |
| Evaporador rotativo               | 1                      | 3 190,00                | 1                            | -                     | -                                       |
| Mufla                             | 1                      | 2 740,00                | 1                            | -                     | -                                       |
| Estufa                            | 1                      | 1 200,00                | 1                            | -                     | -                                       |
| Exsicador                         | 1                      | 224,00                  | 1                            | -                     | -                                       |
| Sílica gel com indicador          | 5 kg                   | 206,00                  | q.b. (reutilizável)          | -                     | 206,00                                  |
| Suporte universal                 | 1                      | 79,70                   | 1                            | -                     | -                                       |
| Garra                             | 1                      | 8,40                    | 1                            | -                     | -                                       |
| Pompete                           | 1                      | 3,60                    | 1                            | -                     | -                                       |
| Conta gotas                       | 200                    | 250,00                  | 1                            | -                     | -                                       |
| Coluna de cromatografia           | 1                      | 219,50                  | 1                            | -                     | -                                       |
| Balão de fundo redondo            | 2                      | 14,90                   | 1                            | -                     | -                                       |
| Balões volumétricos               | 100 ml                 | 41,20                   | 1                            | -                     | -                                       |
|                                   | 500 ml                 | 58,00                   | 1                            | -                     | -                                       |
|                                   | 50 ml                  | 28,60                   | 1                            | -                     | -                                       |
| Provetas                          | 50 ml                  | 55,80                   | 1                            | -                     | -                                       |
|                                   | 100 ml                 | 55,80                   | 1                            | -                     | -                                       |
|                                   | 500 ml                 | 9,70                    | 1                            | -                     | -                                       |
| Pipeta volumétrica 20 ml          | 1                      | 9,40                    | 1                            | -                     | -                                       |
| Algodão                           | 1 kg                   | 10,00                   | 1 g                          | 0,005                 | 10,00                                   |
| Areia                             | 1 kg                   | 26,30                   | 8 g                          | 0,21                  | 26,30                                   |
| Sílica gel                        | 1 kg                   | 21,50                   | 50 g                         | 1,08                  | 21,50                                   |
| Éter dietílico                    | 2,5 L                  | 100,00                  | 78 ml                        | 3,12                  | 100,00                                  |
| Éter de petróleo                  | 2,5 L                  | 24,90                   | 522 ml                       | 5,20                  | 24,90                                   |
| <b>Total (€)</b>                  |                        | <b>14 727,30</b>        |                              | <b>9,62</b>           | <b>388,70</b>                           |

Uma empresa que use óleo de fritar e que quer controlar a sua qualidade usando o método oficial tem duas opções para o fazer, ou contrata um laboratório que realiza essas análises ou cria condições para analisar internamente. A contratação de um laboratório para esse serviço não tem preço certo, podendo oscilar entre os 20€ e os 30€. Esse preço está dependente do laboratório em questão, da certificação e acreditação do mesmo e gastos de envio da amostra.

A implementação do método oficial para realizar as análises internamente envolve a aquisição de diversos materiais. Na tabela AI estão apresentados os materiais, equipamentos e



reagentes necessários para a execução da norma ISO 8420:2002, acompanhados pelas condições da sua aquisição. O material foi contabilizado tendo em conta que, nos casos em que se adequa, este é reutilizado e este foi cotado na sua maioria pela VWR sendo que em alguns casos há quantidade de material que tem que encomendar mesmo que não seja necessário. Assim a implementação do método oficial perfaz um total de 14727,30 €, não estando incluído neste preço o custo de aquisição de espaço, das bancadas, para além do pagamento de pessoal especializado. Depois deve ser considerado o custo de cada análise, tendo em conta que são realizadas duas réplicas por questões de controlo de qualidade, esse custo é de 9,62 €. Posteriormente, quando os reagentes acabam é necessário repor o *stock*, considerando que todos os consumíveis acabam ao mesmo tempo a manutenção do método fica por 388,70€, não considerando a manutenção dos equipamentos.

Tendo em conta todos estes custos, mesmo que seja realizada uma análise de rotina, a implementação do método ISO 8420:2002 é muito dispendiosa. Principalmente quando considerado que se podem adquirir caixas de OT com 10, 25 ou 50 testes ficando cada teste por um valor entre 0,84€ e 1€ (dependendo da quantidade de testes rápidos adquiridos).

Para além dos elevados custos associados, o método oficial é também bem mais moroso do que o teste rápido. Na tabela All encontram-se as principais etapas do método oficial e o respetivo tempo de execução.

**Tabela All** Tempo de execução das diversas etapas do método ISO 8420:2002.

| Etapas do método oficial          | Tempo (min) |
|-----------------------------------|-------------|
| Preparação da sílica gel          | 420         |
| Preparação da areia               | 300         |
| Preparação da coluna              | 30          |
| Preparação da amostra             | 30          |
| Execução da coluna                | 60          |
| Evaporação do eluente             | 15          |
| Secagem do balão de fundo redondo | 45          |
| <b>Total (min)</b>                | <b>900</b>  |

Analisando a informação presente na tabela All pode-se verificar que o método oficial demora cerca de 900 min (15h) a ser executado, no entanto o teste OT apenas tem a etapa de medir o volume de amostra e misturar com a mistura reacional podendo demorar entre 3 a 10 min.