

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Testes rápidos (*kits*) para avaliação da qualidade de
óleos, gorduras e produtos que os contenham e sua
correlação com os métodos oficiais da AOCS**

CIBELE CRISTINA OSAWA

Eng^a de Alimentos e de Seg. do Trabalho

Prof^a. Dr^a. LIRENY AP. G. GONÇALVES

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Os1t Osawa, Cibele Cristina
Testes rápidos (kits) para a avaliação da qualidade de óleos, gorduras e produtos que os contenham e sua correlação com os métodos oficiais da AOCS / Cibele Cristina Osawa. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Óleos e gorduras. 2.Qualidade. 3.Correlação (Estatística). 4.Alimentos – Análise. 5.Alimentos – Testes. I.Gonçalves, Lireny Aparecida Guaraldo. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

CIBELE CRISTINA OSAWA

**TESTES RÁPIDOS (*KITS*) PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÓLEOS,
GORDURAS E PRODUTOS QUE OS CONTENHAM E SUA CORRELAÇÃO COM
OS MÉTODOS OFICIAIS DA AOCS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves (orientadora)

Faculdade de Engenharia de Alimentos / Unicamp

Dr.^a. Jussara Carvalho de Moura Della Torre (titular)

Instituto Adolfo Lutz

Prof.^a. Dr.^a. Caroline Joy Steel (titular)

Faculdade de Engenharia de Alimentos / Unicamp

Dr. Renato Grimaldi (suplente)

Laboratório de Óleos e Gorduras / Unicamp

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Koiti e Tereza, por tudo o que sou, e à minha irmã,
Carla, pela amizade e companheirismo sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças para superar obstáculos, imprevistos e todas as adversidades presentes ao longo deste trabalho.

À Profa. Dra. Lireny pela oportunidade, orientação constante e por acreditar no valor humano. Sua orientação superou as minhas expectativas, baseado no que eu lia nas teses de ex-orientados: exemplo de profissional, ser humano, mãe e avó. Admiro-a muito, mais do que sou capaz de demonstrar.

Ao Laboratório de Óleos e Gorduras (LOG), onde realizei a parte experimental desta dissertação, pelas condições de segurança do trabalho oferecidas e pelo apoio técnico.

Ao Sr. Laércio de Melo da DiaMed-Latino América S. A. pela iniciativa, acompanhamento do trabalho e fornecimento de material necessário.

À Sra. Evelyn De Groote da Diamed AG pelo fornecimento dos *kits* e pela disposição em esclarecer eventuais dúvidas que surgiram no decorrer da pesquisa.

Ao Sr. Anderson Duarte da Total Alimentos pelas rações estudadas.

Ao Prefeito do Campus, Prof. Dr. Carlos Alberto Bandeira Guimarães, e ao Sr. José Togashi, responsável pelo Restaurante Universitário, que permitiram a coleta das amostras de óleo de fritura.

Ao Prof. Sidnei Ragazzi pela orientação nas análises estatísticas.

À Profa. Linda Gentry El-Dash do IEL / Unicamp pela revisão do inglês e pelas nossas viagens enriquecedoras.

Aos membros da banca pelas correções, sugestões e comentários sempre pertinentes.

Ao Prof. Pedro de Felício, por quem tenho grande admiração e respeito, pelo incentivo, exemplo de profissionalismo e pela oportunidade da nossa publicação.

Às Profas. Fernanda e Caroline do DTA. Trabalhamos muito no decorrer da disciplina de TP 183 (Tecnologia Avançada de Amidos) e tenho certeza de que aprendemos muito mais do que o correspondente.

À Profa. Maria Isabel do DEA pelo exemplo de vida, atuação profissional e ensinamentos durante a disciplina de TP 333 (Planejamento e Otimização Experimental).

Ao Prof. Arnaldo pelas lições de vida transmitidas, antes mesmo do início do mestrado.

À pesquisadora Luciana Miagusku do CTC / ITAL pelos esclarecimentos em geral.

Ao pós-doutorando Celso Lage do IG / Unicamp pelo auxílio na busca de patentes.

Aos meus ex-orientadores do ITAL Drs. Wilson Leite do Canto (Fruthotec), Valdecir Luccas (Cereal Chocotec) e Expedito Tadeu Facco (CTC). O que aprendi nos estágios realizados sob suas orientações se refletem aqui.

À Juliana Fattori, ex-técnica do LOG, por me transmitir seus conhecimentos sobre os procedimentos com os *kits*. Daí em diante, pude me aprofundar nos estudos, através da observação, tentativa e erro.

À Marcella Stahl, técnica do LOG, que me auxiliou nas determinações de teor de óleo das rações. A sua ânsia de aprender superou a inexperiência e sua ajuda foi muito importante para que eu pudesse cumprir os prazos do mestrado. Espero que você continue assim e tenha humildade sempre.

Ao químico e quase mestre Cléber Maia (IQ / Unicamp) pela nossa ajuda mútua nas determinações de umidade e pela amizade que construímos desde então.

Ao Edinho da manutenção. Não foram muitas vezes que solicitei seus serviços, porém, quando necessitei, sempre me atendeu prontamente, com boa vontade e solucionou os problemas da melhor maneira possível, propondo soluções coerentes.

Ao Jonas (xerox). Foram muitas cotas de impressão e de xerox que gastei até chegar aqui, sempre exigindo os serviços a curto prazo. Com muita paciência, você me serviu muito bem, desde a época da graduação. Nem sempre você tem o melhor preço, mas seus serviços e simpatia fazem com que a relação custo-benefício seja proveitosa.

Ao Cosme, secretário da pós-graduação e aos funcionários da Biblioteca da FEA, especialmente à Creusa Nomura, sempre muito prestativa, pela dignidade do seu trabalho.

Aos técnicos Rosana e Renato, até mesmo pelo apoio moral em determinadas horas.

Aos companheiros do LOG: Paulinha (estivemos sempre juntas nos momentos difíceis do mestrado, como você mesma disse... e, acrescento, nos momentos felizes também!!!), Denise, Carlinha, Cláudia, Miluska, César, Bei, Waldomiro, Marielly, Karina, Márcia, Célio, Thiago, Alaíde, Giovanna, Daniel, Fabiana, etc. e àqueles que partiram para um novo rumo a suas vidas: Marinalda, Cláudia (funcionária), Camila, Maria, Juliana, etc.

Aos colegas do DTA e das disciplinas de pós-graduação que cursei. Prefiro omitir nomes para não me esquecer de ninguém, pois foram muitos.

À amiga “Simony” (Simone Yamamura), mestranda do IG / Unicamp. Além de amiga, tenho muita admiração por você e pela sua produção científica. Você é completa e um futuro brilhante lhe aguarda (torço muito por isso!).

À amiga Deyse Marilda Kabeya, mestranda do DTA. Infelizmente não tivemos a oportunidade de trabalhar juntas, mas respeito muito o seu trabalho, você é um ser humano inigualável (sua bondade, humildade e simplicidade são os seus diferenciais). Tenho sorte de ter a sua amizade.

À amiga “Ark Kelly” (Arkana Kelly Silva Costa), mestre pela FEC / Unicamp e companheira das aulas “quase particulares” de hidrogenástica da FEF. Você é muito especial, portadora de um extremo bom gosto e bom senso.

Aos amigos da graduação: Milton, Márcio Jun, Anderson, Meliane, Milena, Maria Tereza, Sílvia e ao pessoal da turma (FEA 97 e agregados). Nossas vidas tomaram caminhos diferentes e não tenho contato com muitos, mas a convivência durante a graduação (os projetos em grupo e nossas partidas de vôlei) foi muito válida e marcou uma época da minha vida. Respeito a todos vocês.

Aos amigos químicos e mestres do IQ / Unicamp: Sérgio, Virgu, Karen, Rafael Leandro (“Cherado”), Eduardo (“Chuchu”), Rogerinho, Melissa, Alessandra e outros.

Aos meus pais, Koiti e Tereza pelo apoio nos momentos difíceis: foram muitas noites mal dormidas, algumas briguinhas, momentos de mau humor, atrasos nos horários de refeições e muitas expectativas para a conclusão do trabalho em tempo hábil e alcance dos objetivos pessoais e do curso. Posso não ter os melhores pais do mundo, mas tenho certeza de que as intenções foram sempre as melhores e o exemplo que tive, poucos tiveram na vida.

À minha irmã e amiga de sempre, Carla. Não tenho palavras, já que nossas vidas estão vinculadas desde o nascimento...

À Capes pela concessão do auxílio-pesquisa.

A todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Àqueles que acreditaram e àqueles que não acreditaram.

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
(Fernando Pessoa).

RESUMO GERAL

DiaMed *Food Analysis Test System* (F.A.T.S.) é composto por testes rápidos, alternativos aos métodos convencionais de determinação de ácidos graxos livres (%AGL), índice de peróxidos (IP), concentração de alquenais (teste de p-anisidina) e malonaldeído (teste de TBA). Esses testes podem ser empregados na avaliação de óleos, gorduras e produtos que os contenham. Além disso, os equipamentos são compactos, não necessitando de laboratórios altamente equipados e as quantidades relativamente pequenas de amostra requeridas geram menos resíduos. Eles oferecem, ainda, melhores condições de trabalho aos analistas envolvidos do que os métodos convencionais. Substituem, por exemplo, o reagente de p-anisidina, considerado carcinogênico. Até o momento, apenas os *kits* de %AGL e IP foram certificados pela AOAC e existem poucos estudos utilizando-os. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo correlacionar os *kits* com os métodos oficiais da AOCS, aplicados a óleos vegetais brutos e degomados, óleos refinados, azeites de oliva (avaliados com 4 *kits* de diferentes faixas de detecção de %AGL e IP), óleos de fritura coletados no restaurante universitário (TBA e p-anisidina) e rações fornecidas por empresa nacional (%AGL, IP, TBA e p-anisidina). Em todos os casos, as análises foram conduzidas em triplicata, utilizando os métodos convencionais. No dia seguinte, analisaram-se as mesmas amostras com os *kits* correspondentes, de acordo com as instruções do fornecedor. Adotaram-se os métodos Ca 5a-40, Cd 8b-90, Cd 18b-90 e Cd 19b-90, respectivamente, para %AGL, IP, teste de p-anisidina e TBA. As determinações para as amostras de ração foram feitas no lípidio extraído a frio com mistura de éter de petróleo e éter etílico. A correlação entre metodologias foi determinada pelo Método dos Mínimos Quadrados de Regressão Linear (usando o programa *Minitab for Windows* versão 12.1) e o teste de ANOVA foi utilizado para comparar médias de diferentes metodologias (*software SAS for Windows V. 8*). Para as amostras de ração e óleo de fritura, a variação entre as amostras testadas usando um mesmo método foi também determinada. Houve alta correlação entre os resultados do método oficial e pelo *kit* em relação à %AGL e IP de óleos refinados e azeites de oliva e à %AGL das rações e aos valores de p-anisidina de óleos de fritura ($r = 0,74-0,99$). Os resultados de óleos brutos e degomados foram significativamente diferentes, devido à interferência dos pigmentos presentes. As amostras

de ração apresentaram estágio oxidativo pouco avançado, de forma que não puderam ser avaliadas precisamente com os *kits*. Para os óleos de fritura, o *kit* de TBA foi mais sensível que o método oficial. Além disso, constataram-se deficiências nos métodos oficiais de determinação de IP, malonaldeído e alquenais, uma vez que o método de peróxido não foi sensível para IP menor que 2 meq/kg, ao passo que o aquecimento empregado no teste de TBA gerou valores mais elevados que os obtidos com o *kit* equivalente e a presença de água nas amostras e reagentes interferiram nos resultados de p-anisidina. Sendo assim, os *kits* DiaMed F.A.T.S. forneceram resultados precisos e se tornaram uma opção viável para as superar as limitações econômicas dos estudos de vida útil enfrentadas pelos métodos convencionais, especialmente para amostras com baixo teor lipídico.

Palavras-chaves: óleos e gorduras, testes rápidos, qualidade, correlação, Diamed F.A.T.S.

ABSTRACT

The DiaMed Food Analysis Test System (F.A.T.S.) consists of rapid tests which serve as alternatives for conventional methods in the determination of free fatty acids (%FFA), peroxide value (PV), and the concentration of alkenal (p-anisidine test) and malonaldehyde (TBA test). These tests can be employed in the evaluation of oils, fats and products containing them. Moreover, the compact equipment makes a large, well-equipped laboratory unnecessary and the relatively small sample size generates minimum residues. They also furnish better working conditions for the analysts involved since the p-anisidine used as a reagent is carcinogenic. At present, only the %FFA and PV kits have been certified by the AOCS, but few studies have used them. The present study was thus designed to correlate the results obtained from the use of these kits with those obtained by the official AOCS methods for crude, degummed and refined vegetable oils and olive oils (tested with 4 kits for different levels of %FFA and PV), frying oils collected from the university restaurant (tested for TBA and p-anisidine values) and pet foods supplied by a national industry (tested for %FFA, PV and TBA and p-anisidine values). In all cases the analyses were performed in triplicate using conventional methods. On the following day, the same samples were analyzed using the corresponding kits, according to the instruction of the manufacturer. The official AOCS methods adopted for the determination of %FFA, PV and p-anisidine and TBA values were Ca 5a-40, Cd 8b-90, Cd 18b-90 and Cd 19b-90, respectively. For the pet food samples, lipids were extracted with a mixture of petroleum ether and ethylic ether in cold conditions. The correlations between methodologies were determined using the Least Squares Method of Linear Regression (using Minitab for Windows, version 12.1), and an ANOVA was used to compare the averages of the different methods (SAS for Windows V. 8 software). For both pet food and frying oil samples, the variation between samples tested using the same method was also determined. High correlations were found between the results of official and kit methods in relation to %FFA and PV for refined and olive oils, and in relation to %FFA in pet foods and p-anisidine values in frying oils ($r = 0.74-0.99$). Results for crude and degummed oils were significantly different, however, due to the effect of pigments. The pet foods exhibited a relatively low oxidative state and thus could not be analyzed accurately with the kits. For

frying oils, the TBA kit proved more sensitive than the official method. Moreover, the official methods presented problems for the determination of PV and malonaldehyde and alkenal concentrations, since they were not very sensitive for PV levels of less than 2 meq/kg, whereas the use of heating in the official TBA test led to higher values than those obtained when using the equivalent kit and the presence of water in the samples and reagents interfered in the results of the p-anisidine test. The DiaMed F.A.T.S. kits thus proved to provide accurate results. Moreover, they provide a feasible option for overcoming the economic difficulties of shelf-life studies faced by conventional methods, especially for samples with a low lipid content.

Keywords: oils and fats, *kits*, quality, correlation, Diamed F.A.T.S.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	55
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	57
1 Oxidação de lipídios.....	57
1.1 Rancidez hidrolítica.....	57
1.2 Rancidez oxidativa.....	58
2 <i>Kits</i>	61
2.1 <i>Kits</i> DiaMed F.A.T.S.....	62
2.2 Princípios das análises.....	62
2.3 Classificação dos <i>kits</i>	63
3 Análise estatística.....	65
3.1 Regressão linear e análise de correlação.....	65
3.2 Coeficiente de correlação linear.....	67
3.3 Método dos mínimos quadrados.....	68
3.4 Bandas de confiança e bandas de predição.....	69
3.5 Avaliação do modelo.....	70
3.6 Análise de variância para comparação entre tratamentos.....	72
3.7 Comparação de médias de diferentes tratamentos.....	73
3.7.1 Teste de Tukey.....	74
3.8 Exemplo de aplicação da ANOVA para comparação de tratamentos teste de Tukey.....	74
3.8.1 ANOVA.....	75
3.8.2 Teste de Tukey.....	76
4 Referências.....	77

CAPÍTULO 2 - Correlação do teor de ácidos graxos livres de óleos vegetais avaliados por testes rápidos e pelo método oficial da AOCS.....81

Resumo.....	81
Abstract.....	82
1 Introdução.....	83
2 Material e Métodos.....	85
2.1 Amostras.....	85
2.1.1 <i>kit</i> FaSafe™ HSY (de 0,02 a 0,2% ác. oléico)	85
2.1.2 <i>kit</i> FaSafe™ STD (acima de 0,2% ác. oléico)	85
2.2 Metodologia Oficial.....	86
2.3 <i>Kits</i> Diamed (FaSafe™ HSY e FaSafe™ STD)	86
2.4 Análises Estatísticas.....	87
3 Resultados e Discussão.....	88
3.1 <i>kit</i> FaSafe™ STD – Azeites de oliva.....	88
3.1.1 Análise do modelo.....	91
3.1.2 Comparação de médias.....	92
3.2 <i>kit</i> FaSafe™ STD – Óleos brutos e degomados.....	92
3.2.1 Análise do modelo.....	94
3.3 <i>kit</i> FaSafe™ HSY.....	95
3.3.1 Análise do modelo.....	98
3.3.2 Comparação de médias.....	99
4 Conclusões.....	100
5 Referências.....	101
6 Agradecimentos.....	104

CAPÍTULO 3 – Determinação de peróxidos presentes em óleos vegetais através de kits rápidos e sua correlação com o método AOCS Cd 8b-90.....105

Resumo.....	105
Abstract.....	106
1 Introdução.....	107
1.1 Ensaio Iodométrico.....	108
1.2 Formação de Complexos Com Fe(III)	108
2 Material e Métodos.....	111
2.1 Amostras.....	111
2.1.1 <i>kit PeroxySafe</i> TM HSY (de 0 a 2 meq/kg).....	111
2.1.2 <i>kit PeroxySafe</i> STD TM (acima de 1 meq/kg).....	111
2.2 Metodologia Oficial.....	111
2.3 <i>Kits</i> Diamed (<i>PeroxySafe</i> TM HSY e <i>PeroxySafe</i> TM STD).....	112
2.4 Análises Estatísticas.....	113
3 Resultados e Discussão.....	114
3.1 <i>kit PeroxySafe</i> TM STD – óleos de soja e azeites.....	114
3.1.1 Análise do modelo.....	117
3.1.2 Comparação de médias.....	118
3.2 <i>kit PeroxySafe</i> TM HSY – óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas.....	119
3.2.1 Análise do modelo.....	121
3.2.2 Comparação de médias.....	123
4 Conclusões.....	123
5 Referências.....	124
6 Agradecimentos.....	128

CAPÍTULO 4 - Alterações no método oficial de determinação de peróxidos, baseado em iodometria, e sua correlação com *kits* rápidos.....129

Resumo.....	129
Abstract.....	130
1 Introdução.....	131
2 Material e Métodos.....	132
2.1 Amostras.....	132
2.2 Metodologia Oficial.....	132
2.3 <i>Kits</i> Diamed (PeroxySafe™ HSY e PeroxySafe™ STD).....	133
2.4 Análises Estatísticas.....	133
3 Resultados e Discussão.....	134
3.1 Correlação entre Métodos.....	137
3.2 Comparação de Médias.....	139
3.2.1 <i>kit</i> PeroxySafe™ STD.....	139
3.2.2 <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	140
4 Conclusões.....	141
5 Referências.....	143
6 Agradecimentos.....	146

CAPÍTULO 5 – Utilização de metodologias rápidas (*kits*) na avaliação do óleo de fritura do Restaurante Universitário.....147

Resumo.....	147
Abstract.....	148
1 Introdução.....	149
1.1 Métodos Analíticos.....	150
1.1.1 Teste de Anisidina.....	151
1.1.2 <i>kits</i> AlkalSafe™.....	152

	21
1.1.3 Teste do Ácido Tiobarbitúrico (TBA).....	153
1.1.4 <i>Kits</i> AldeSafe TM	154
2 Material e Métodos.....	154
2.1 Purificação dos reagentes para o teste de p-anisidina.....	157
2.2 Determinação de umidade por Karl Fischer.....	158
2.3 Métodos oficiais.....	160
2.4 Determinações de malonaldeído e alquenais com os <i>kits</i>	160
2.5 Tratamento estatístico.....	162
3 Resultados e Discussão.....	163
3.1 Teor de umidade das amostras de óleo de fritura e dos reagentes analíticos.....	163
3.2 Determinação de alquenais.....	166
3.2.1 p-Anisidina.....	166
3.2.2 <i>kit</i> AlkalSafe TM STD.....	169
3.2.3 Análise do modelo.....	169
3.2.4 Comparação entre médias para uma mesma metodologia.....	171
3.3 Malonaldeído.....	173
3.3.1 Análise do modelo.....	173
3.3.2 Comparação entre médias para uma mesma metodologia.....	175
4 Conclusões.....	177
5 Referências.....	178
6 Agradecimentos.....	183
CAPÍTULO 6 - Avaliação da qualidade de “pet foods” através de <i>kits</i> rápidos e métodos oficiais.....	185

Resumo.....	185
Abstract.....	186
1 Introdução.....	187
1.1 Ácidos Graxos Livres.....	189
1.2 Índice de Peróxido.....	189
1.3 Teste de TBA.....	189
1.4 p-anisidina.....	189
1.5 <i>Kits</i> Diamed F.A.T.S. para matrizes complexas.....	190
2 Material e Métodos.....	191
2.1 Extração do óleo e/ou gordura das rações.....	191
2.2 Métodos oficiais.....	192
2.3 <i>Kits</i>	193
2.4 Determinação do teor de lipídios.....	193
2.5 Tratamento estatístico.....	194
3 Resultados e Discussão.....	195
3.1 Ácidos Graxos Livres.....	195
3.1.1 Análise do modelo.....	197
3.1.2 Comparação de médias.....	198
3.2 Índice de Peróxido.....	198
3.2.1 Análise do modelo.....	200
3.2.2 Comparação de médias.....	201
3.2.3 Comparação de médias para uma mesma metodologia.....	202
3.2.3.1 <i>Kit PeroxySafe</i> TM MSA.....	202

	23
3.2.3.2 Método oficial modificado.....	203
3.3 Concentração de alquenais e p-anisidina.....	204
3.3.1 Análise do modelo.....	205
3.3.2 Comparação de médias para uma mesma metodologia.....	206
3.3.2.1 <i>Kit</i> AlkalSafe™ STD.....	206
3.3.2.2 p-anisidina.....	207
3.4 Concentração de malonaldeído e teste de TBA.....	208
3.4.1 Análise do modelo.....	209
3.4.2 Comparação de médias para uma mesma metodologia.....	210
4 Conclusões.....	212
5 Referências.....	213
6 Agradecimentos.....	215
CONCLUSÕES GERAIS.....	217
APÊNDICE A - Procedimento de extração de gordura de matrizes complexas.....	219
1 Material utilizado.....	219
2 Procedimento.....	219
APÊNDICE B-1 - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> FaSafe™ STD.....	221
1 Reagentes utilizados.....	221
2 Material utilizado.....	221
3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.	221
4 Construção da curva de calibração.....	223
5 Teste dos controles.....	223
6 Amostras.....	224
7 Diluições.....	224

	24
7.1 Procedimento.....	224
7.2 Exemplos de diluições.....	225
8 Notas.....	225
9 Resultados do trabalho.....	226
APÊNDICE B-2 - Procedimentos de análises com o kit FaSafe™ HSY.....	227
1 Reagentes utilizados.....	227
2 Material utilizado.....	227
3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.	227
4 Construção da curva de calibração.....	229
5 Teste dos controles.....	229
6 Amostras.....	230
7 Diluições.....	230
7.1 Procedimento.....	230
7.2 Exemplos de diluições.....	231
8 Notas.....	231
9 Resultados do trabalho.....	232
APÊNDICE B-3 - Procedimentos de análises com o kit AciSafe™ MSA.....	233
1 Reagentes utilizados.....	233
2 Material utilizado.....	233
3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.....	234
4 Construção da curva de calibração.....	235
5 Teste dos controles.....	236
6 Amostras.....	236
7 Diluições.....	237
7.1 Procedimento.....	237

	25
7.2 Exemplos de diluições.....	237
8 Notas.....	238
9 Resultados do trabalho.....	238
APÊNDICE C-1 - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD.....	239
1 Reagentes utilizados.....	239
2 Material utilizado.....	239
3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.....	239
4 Construção da curva de calibração.....	241
5 Teste dos controles.....	241
6 Amostras.....	242
7 Diluições.....	242
7.1 Procedimento.....	243
7.2 Exemplos de diluições.....	243
8 Notas.....	243
9 Resultados do trabalho.....	244
APÊNDICE C-2 - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	245
1 Reagentes utilizados.....	245
2 Material utilizado.....	245
3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.....	245
4 Construção da curva de calibração.....	247
5 Teste dos controles.....	247
6 Amostras.....	248
7 Diluições.....	248
7.1 Procedimento.....	249
7.2 Exemplos de diluições.....	249

	26
8 Notas.....	249
9 Resultados do trabalho.....	250
APÊNDICE C-3 - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA.....	251
1 Reagentes utilizados.....	251
2 Material utilizado.....	251
3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.	252
4 Construção da curva de calibração.....	253
5 Teste dos controles.....	254
6 Amostras.....	254
7 Diluições.....	255
7.1 Procedimento.....	255
7.2 Exemplos de diluições.....	255
8 Notas.....	256
APÊNDICE D - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD.....	257
1 Reagentes utilizados.....	257
2 Material utilizado.....	257
3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.	258
4 Construção da curva de calibração.....	259
5 Teste do controle.....	259
6 Amostras.....	260
7 Diluições.....	260
7.1 Procedimento.....	260
7.2 Exemplos de diluições.....	261
8 Notas.....	261
APÊNDICE E - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> AldeSafe™ STD.....	263

	27
1 Reagentes utilizados.....	263
2 Material utilizado.....	263
3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.....	264
4 Construção da curva de calibração.....	265
5 Teste dos controles.....	266
6 Amostras.....	266
7 Diluições.....	267
7.1 Procedimento.....	267
7.2 Exemplos de diluições.....	267
8 Notas.....	268
APÊNDICE F-1– Resultados experimentais de %AGL de azeites de oliva.....	269
1 Reagentes do <i>kit</i> FaSafe™ STD.....	269
2 Amostras.....	269
3 Resultados das análises com o <i>kit</i>	270
3.1 Curva de calibração 1 – amostras de 1 a 12.....	270
3.2 Curva de calibração 2 – amostras 13 a 25.....	271
3.3 Determinação de AGL através do <i>kit</i>	272
4 Determinação de AGL através da metodologia AOCS Ca 5a – 40.....	274
5 Diferenças entre as metodologias: <i>kit</i> FaSafe™ STD x AOCS Ca 5a-40.....	276
APÊNDICE F-2 – Resultados experimentais de %AGL de óleos brutos e degomados.....	279
1 Reagentes do <i>kit</i> FaSafe™ STD.....	279
2 Amostras.....	279
3 Resultados das análises com o <i>kit</i>	280
3.1 Curva de calibração 1.....	280

3.2 Curva de calibração 2.....	281
3.3 Determinação de AGL através do <i>kit</i>	281
4 Determinação de AGL através da metodologia AOCS Ca 5a-40.....	282
5 Diferenças entre as metodologias: <i>kit</i> FaSafe™ STD x AOCS Ca 5a-40.....	283
APÊNDICE F-3 – Resultados experimentais de %AGL de óleos refinados e azeites de oliva.....	285
1 Reagentes do <i>kit</i> FaSafe™ HSY.....	285
2 Amostras.....	285
3 Resultados com o <i>kit</i> FaSafe™ HSY.....	286
3.1 Curvas de calibração.....	286
3.2 Determinação de AGL através do <i>kit</i>	288
4 AGL pela metodologia AOCS Ca 5a – 40.....	291
5 Diferenças entre as metodologias: <i>kit</i> FaSafe™ STD x AOCS Ca 5a-40.....	293
APÊNDICE G-1 – Resultados experimentais de IP de óleos de soja.....	297
1 Reagentes do <i>kit</i> PeroxySafe™ STD.....	297
2 Amostras.....	297
3 <i>Kit</i> PeroxideSafe™ STD.....	298
3.1 Azeites de oliva.....	298
3.2 Óleos de soja.....	300
4 Índice de peróxido pela metodologia AOCS Cd 8b – 90.....	302
4.1 Azeites: CV ≤ 5,0%.....	302
4.2 Óleos de soja vencidos.....	303
5 Diamed x AOCS: as diferenças entre as metodologias variaram de 2,9 a 192,0%.....	304
6 Correções.....	307
6.1 Curvas de calibração.....	307

	29
6.2 Teste dos controles.....	308
6.2.1 Curva de calibração 1.....	308
6.2.2 Curva de calibração 2.....	310
6.2.3 Valores corrigidos de Índice de Peróxido para os azeites.....	311
6.3 Correlação DiaMed x AOCS.....	311
7 Diferenças entre as metodologias.....	315
APÊNDICE G-2 – Resultados experimentais de IP de óleos vegetais refinados: método oficial modificado.....	317
1 Reagentes do <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	317
2 Amostras.....	317
3 Testes com o <i>kit</i>	318
3.1 Amostras D a G, I a N.....	318
3.2 Amostras A a C, H, O a U.....	319
3.3 Determinação de Índice de Peróxido através do <i>kit</i>	321
4 Índice de Peróxido através da metodologia AOCS Cd 8b – 90.....	323
5 Diferenças entre as metodologias.....	325
APÊNDICE H-1 – Resultados experimentais de IP de óleos de soja.....	327
1 Reagentes do <i>kit</i> PeroxySafe™ STD.....	327
2 Amostras.....	327
3 Testes com o <i>kit</i>	328
3.1 Curva de calibração 1: amostras A a J.....	328
3.2 Curva de calibração 2: amostras A a J.....	329
3.3 Curva de calibração 3: amostras A a J.....	330
3.4 Curva de calibração 1: amostras K a T.....	330
3.5 Determinação de Índice de Peróxido, através do <i>kit</i>	331

4 Índice de peróxido através da metodologia AOCS Cd 8b – 90 modificada.....	333
5 Diferenças entre as metodologias.....	334
APÊNDICE H-2 – Resultados experimentais de IP de óleos refinados: método oficial modificado.....	337
1 Reagentes do <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	337
2 Amostras.....	337
3 Testes com o <i>kit</i>	338
3.1 Curva de calibração 1: amostras A a J.....	338
3.2 Curva de calibração 2: amostras K a T.....	339
3.3 Determinação de Índice de Peróxidos, através do <i>kit</i>	340
4 Índice de peróxido através da metodologia AOCS Cd 8b – 90 modificada.....	342
5 Diferenças entre as metodologias.....	344
APÊNDICE I-1 – Resultados experimentais de concentração de alquenais e p-anisidina das amostras de óleos de fritura.....	347
1 Reagentes do <i>kit</i> AlkalSafe™ STD.....	347
2 Análises com o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD.....	347
2.1 Curva de calibração 1: amostras A a J.....	347
2.1.1 Teste do controle.....	347
2.2 Curva de calibração 2: amostras K a T.....	348
2.2.1 Teste do controle.....	348
2.3 Amostras.....	349
2.4 Correção de cor.....	350
3 Teste de p-anisidina, segundo AOCS.....	352
4 Diferenças entre as metodologias.....	354

APÊNDICE I-2 – Resultados experimentais de concentração de malonaldeído e TBA das amostras de óleos de fritura.....357

1 Reagentes do <i>kit</i> AldeSafe™ STD.....	357
2 Análises com o <i>kit</i> AldeSafe™ STD.....	357
2.1 Curva de calibração 1: amostras A a L.....	357
2.1.1 Teste dos controles.....	358
2.2 Curva de calibração 2: amostras M a T.....	358
2.2.1 Teste dos controles.....	358
2.3 Amostras: sem diluição	359
3 TBA, segundo AOCS.....	360
4 Diferenças entre as metodologias.....	362

APÊNDICE J-1 – Resultados experimentais do teor de gordura das rações.....363

APÊNDICE J-2 – Resultados experimentais de % AGL das amostras de ração.....365

1 Reagentes do <i>kit</i> AciSafe™ MSA.....	365
2 Amostras utilizadas.....	365
3 Análises com o <i>kit</i> AciSafe™ MSA.....	366
3.1 Curva de calibração 1: amostras A a H.....	366
3.1.1 Teste dos controles.....	366
3.2 Curva de calibração 2: amostras J a S.....	366
3.2.1 Teste dos controles.....	367
3.3 Amostras: % AGL em relação à massa de ração.....	367
3.4 Amostras: % AGL em relação ao teor de óleo da amostra.....	369
4 AGL, segundo AOCS.....	370
5 Diferenças entre as metodologias.....	372

APÊNDICE J-3 – Resultados experimentais de IP das amostras de ração.....375

1 Reagentes do <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA.....	375
2 Amostras utilizadas.....	375
3 Análises com o <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA.....	375
3.1 Curva de calibração 1: amostras A a H, K.....	375
3.1.1 Teste dos controles.....	376
3.2 Curva de calibração 2: amostras J, L a S.....	376
3.2.1 Teste dos controles.....	377
3.3 Amostras: em relação à massa de ração.....	377
3.4 Amostras: em relação ao teor de óleo da amostra.....	379
4 Índice de peróxido, segundo o método oficial modificado.....	380
5 Diferenças entre as metodologias.....	382
APÊNDICE J-4 – Resultados experimentais de concentração de alquenais e p-anisidina das amostras de ração.....	385
1 Reagentes do <i>kit</i> AlkalSafe™ STD.....	385
2 Amostras utilizadas.....	385
3 Análises com o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD.....	385
3.1 Curva de calibração 1: amostras A a L.....	385
3.1.1 Teste do controle.....	385
3.2 Curva de calibração 2: amostras M a S.....	386
3.2.1 Teste do controle.....	386
3.3 Amostras: em relação à massa de ração.....	387
3.4 Amostras: em relação ao teor de óleo da amostra.....	388
4 Teste de p-anisidina, segundo AOCS.....	389
5 Diferenças entre as metodologias.....	391
APÊNDICE J-5 – Resultados experimentais de concentração de malonaldeído e TBA das amostras de ração.....	393

	33
1 Reagentes do <i>kit</i> AldeSafe™ STD.....	393
2 Amostras utilizadas.....	393
3 Análises com o <i>kit</i> AldeSafe™ STD.....	393
3.1 Curva de calibração 1: amostras A, C, D e E.....	393
3.1.1 Teste dos controles.....	394
3.2 Curva de calibração 2: amostras B, F, G, H, J a S.....	394
3.2.1 Teste dos controles.....	394
3.3 Amostras: em relação à massa de ração.....	395
3.4 Amostras: em relação ao teor de óleo da amostra.....	396
4 TBA, segundo AOCS.....	397
5 Diferenças entre as metodologias.....	399
APÊNDICE K - Resultados experimentais da comparação de médias, através de ANOVA, para %AGL de rações (<i>kit</i> AciSafe™ MSA).....	401

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL.....	23
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	57
Tabela 1. Aplicações dos <i>kits</i> Diamed F.A.T.S., de acordo com o produto a ser analisado.....	64
Tabela 2. Faixa de detecção dos <i>kits</i> Diamed F.A.T.S.....	64
Tabela 3. Tabela de ANOVA para o teste de significância da regressão.....	71
Tabela 4. Tabela de ANOVA para comparação entre tratamentos.....	73
Tabela 5. Tabela típica de dados para experimentos de fator único.....	73
Tabela 6. Notas sensoriais dos provadores para os 5 níveis de adição de proteína de soja a “hamburger” e a somatória das notas.....	75
Tabela 7. Tabela de ANOVA do exemplo estudado.....	76
Tabela 8. Diferença entre os valores médios das amostras (Teste de Tukey).....	77
CAPÍTULO 2 - Correlação do teor de ácidos graxos livres de óleos vegetais avaliados por testes rápidos e pelo método oficial da AOCS.....	81
Tabela 1. Teste de ANOVA para a regressão linear - <i>kit</i> FaSafe™ STD, azeites de oliva.....	92
Tabela 2. Teste de ANOVA para comparação de médias - <i>kit</i> FaSafe™ STD, azeites de oliva.....	92
Tabela 3. Teste de ANOVA para a regressão linear - <i>kit</i> FaSafe™ HSY, azeites de oliva e óleos vegetais refinados.....	99
Tabela 4. Teste de ANOVA para comparação de médias - <i>kit</i> FaSafe™ HSY, azeites de oliva e óleos vegetais refinados.....	99

CAPÍTULO 3 – Determinação de peróxidos presentes em óleos vegetais através de kits rápidos e sua correlação com o método AOCS Cd 8b-90.....105

Tabela 1. ANOVA para a regressão linear - *kit PeroxySafe*TM STD.....118

Tabela 2. ANOVA para comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM STD.....118

Tabela 3. ANOVA para comparação de médias, aplicando fator de correção de 0,80 nos resultados obtidos pelo *kit PeroxySafe*TM STD.....119

Tabela 4. ANOVA para a regressão linear - *kit PeroxySafe*TM HSY.....122

Tabela 5. ANOVA para comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM HSY.....123

CAPÍTULO 4 - Alterações no método oficial de determinação de peróxidos, baseado em iodometria, e sua correlação com kits rápidos.....129

Tabela 1. ANOVA para a regressão linear - *kit PeroxySafe*TM STD.....139

Tabela 2. ANOVA para a regressão linear - *kit PeroxySafe*TM HSY.....139

Tabela 3. ANOVA para a comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM STD.....139

Tabela 4. ANOVA para a comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM STD, fator de correção de 0,70.....140

Tabela 5. ANOVA para comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM STD, fator de correção de 0,80.....140

Tabela 6. ANOVA para comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM HSY.....141

Tabela 7. ANOVA para comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM HSY, fator de correção de 0,50.....141

CAPÍTULO 5 – Utilização de metodologias rápidas (*kits*) na avaliação do óleo de fritura do Restaurante Universitário.....147

Tabela 1. Faturamento aproximado de refeições para 1998, 1999 , 2000, 2001, 2002 e 2003, em bilhões de reais.....149

Tabela 2. Quantidade e tipo de produto frito, volume de óleo utilizado e número de refeições servidas no restaurante universitário entre os dias 26/01 e 29/03/2004.....155

Tabela 3. Amostras selecionadas para as determinações de p-anisidina e TBA e seus correlatos com os <i>kits</i> Diamed.....	156
Tabela 4. Teor de umidade por Karl Fischer de dez amostras de óleos de fritura.....	164
Tabela 5. Umidade por Karl Fischer dos reagentes utilizados nos testes de TBA e p-anisidina.....	165
Tabela 6. Valores de p-anisidina encontrados na literatura para óleos de soja e palma.....	166
Tabela 7. Valores de p-anisidina encontrados na literatura para estudos oxidativos de óleos de soja e palma.....	167
Tabela 8. Teste de ANOVA para a regressão linear - <i>kit</i> AlkalSafe™ STD, óleos de fritura.....	170
Tabela 9. Números de p-anisidina médios, em ordem decrescente, obtidas pelo método oficial para amostras de óleo de fritura.....	171
Tabela 10. Concentrações médias de alquenais, em nmol/mL, em ordem decrescente, obtidas pelo <i>kit</i> AlkalSafe STD™ para amostras de óleo de fritura.....	172
Tabela 11. Teste de ANOVA para a regressão linear - <i>kit</i> AldeSafe™ STD, óleos de fritura.....	174
Tabela 12. Concentrações médias de malonaldeído, em nmol/mL, em ordem decrescente, obtidas pelo <i>kit</i> AldeSafe STD™ para amostras de óleo de fritura.....	175
Tabela 13. Números de TBA médios, em ordem decrescente, obtidos pelo método oficial para amostras de óleo de fritura.....	176
CAPÍTULO 6 - Avaliação da qualidade de “pet foods” através de <i>kits</i> rápidos e métodos oficiais.....	185
Tabela 1. ANOVA para a regressão linear - <i>kit</i> AciSafe™ MSA.....	198
Tabela 2. ANOVA para a regressão linear - <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA.....	201

Tabela 3. ANOVA para comparação de médias - <i>kit PeroxySafe™</i> MSA.....	201
Tabela 4. Concentrações médias de peróxidos, em meq/kg, em ordem decrescente, obtidas pelo <i>kit PeroxySafe MSA™</i> para amostras de ração.....	202
Tabela 5. Concentrações médias de peróxidos, em meq/kg, em ordem decrescente, obtidas pelo método oficial modificado para amostras de ração.....	203
Tabela 6. Concentrações médias de alquenais, em nmol/kg, em ordem decrescente, obtidas pelo <i>kit AlkalSafe STD™</i> para amostras de ração.....	206
Tabela 7. Números de anisidina médios, em ordem decrescente, obtidas pelo método oficial para amostras de ração.....	207
Tabela 8. ANOVA para a regressão linear - <i>kit AldeSafe™</i> STD.....	210
Tabela 9. Concentrações médias de malonaldeído, em nmol/kg, em ordem decrescente, obtidas pelo <i>kit AldeSafe STD™</i> para amostras de ração.....	210
Tabela 10. Números de TBA médios, em ordem decrescente, obtidos pelo método oficial para amostras de ração.....	211
APÊNDICE B-1 - Procedimentos de análises com o <i>kit FaSafe™</i> STD.....	221
Tabela 1. Programação para leituras das análises com o <i>kit FaSafe™</i> STD.....	222
Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de %AGL para os controles STD.....	224
APÊNDICE B-2 - Procedimentos de análises com o <i>kit FaSafe™</i> HSY.....	227
Tabela 1. Programação para leituras das análises com o <i>kit FaSafe™</i> HSY.....	228
Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de %AGL para os controles HSY.....	230
APÊNDICE B-3 - Procedimentos de análises com o <i>kit AciSafe™</i> MSA.....	233
Tabela 1. Programação para leituras das análises com o <i>kit AciSafe™</i> MSA.....	234
Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de %AGL para os controles MSA.....	236
APÊNDICE C-1 - Procedimentos de análises com o <i>kit PeroxySafe™</i> STD.....	239
Tabela 1. Programação para leituras das análises com o <i>kit PeroxySafe™</i> STD.....	240
Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de IP para os controles STD.....	242

APÊNDICE C-2 - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	245
Tabela 1. Programação para leituras das análises com o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	246
Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de IP para os controles HSY.....	248
APÊNDICE C-3 - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA.....	251
Tabela 1. Programação para leituras das análises com o <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA.....	252
Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de IP para os controles MSA.....	254
APÊNDICE D - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD.....	257
Tabela 1. Programação para leituras das análises com o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD.....	258
APÊNDICE E - Procedimentos de análises com o <i>kit</i> AldeSafe™ STD.....	263
Tabela 1. Programação para leituras das análises com o <i>kit</i> AldeSafe™ STD.....	264
Tabela 2. Faixas esperadas de concentração de malonaldeído, em nmol/ml, para os controles STD.....	266
APÊNDICE F-1– Resultados experimentais de %AGL de azeites de oliva para o <i>kit</i> FaSafe™ STD.....	269
Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do <i>kit</i> FaSafe™ STD.....	269
Tabela 2. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> FaSafe™ STD, amostras de 1 a 12....	270
Tabela 3. Teste dos controles STD para a curva de calibração 1.....	271
Tabela 4. Curva de calibração 2 para o <i>kit</i> FaSafe™ STD, amostras 13 a 25.....	271
Tabela 5. Teste dos controles STD para a curva de calibração 2.....	271
Tabela 6. Resultados experimentais com o <i>kit</i> FaSafe™ STD.....	272
Tabela 7. Resultados experimentais de %AGL pelo método oficial.....	274
Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de %AGL, obtidos pelo <i>kit</i> FaSafe™ STD e pela AOCS.....	276

APÊNDICE F-2 – Resultados experimentais de %AGL de óleos brutos e degomados para o *kit FaSafe*TM STD.....279

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit FaSafe*TM STD.....279

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit FaSafe*TM STD.....280

Tabela 3. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....280

Tabela 4. Curva de calibração 2 para o *kit FaSafe*TM STD.....281

Tabela 5. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.....281

Tabela 6. Resultados experimentais com o *kit FaSafe*TM STD.....281

Tabela 7. Resultados experimentais de %AGL pelo método oficial.....282

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de %AGL, obtidos pelo *kit FaSafe*TM STD e pela AOCS.....283

APÊNDICE F-3 – Resultados experimentais de %AGL de óleos refinados e azeites de oliva para o *kit FaSafe*TM HSY.....285

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit FaSafe*TM HSY.....285

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit FaSafe*TM HSY.....286

Tabela 3. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1..... 287

Tabela 4. Curva de calibração 2 para o *kit FaSafe*TM HSY.....287

Tabela 5. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.....287

Tabela 6. Curva de calibração 3 para o *kit FaSafe*TM HSY.....288

Tabela 7. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 3.....288

Tabela 8. Resultados experimentais com o *kit FaSafe*TM HSY.....288

Tabela 9. Resultados experimentais de %AGL pelo método oficial.....291

Tabela 10. Tabela comparativa dos resultados experimentais de %AGL, obtidos pelo *kit FaSafe*TM HSY e pela AOCS.....293

APÊNDICE G-1 – Resultados experimentais de IP de óleos de soja com o *kit PeroxySafe*TM STD.....297

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do <i>kit</i> PeroxySafe™ STD.....	297
Tabela 2. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD, azeites de oliva.....	298
Tabela 3. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....	298
Tabela 4. Repetição do teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....	299
Tabela 5. Resultados experimentais com o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD, azeites de oliva.....	299
Tabela 6. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD, óleos de soja vencidos.....	300
Tabela 7. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....	300
Tabela 8. Repetição do teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....	301
Tabela 9. Resultados experimentais com o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD, óleos de soja vencidos.....	301
Tabela 10. Resultados experimentais de IP pelo método oficial, azeites de oliva.....	302
Tabela 11. Resultados experimentais de IP pelo método oficial, óleos de soja vencidos.....	303
Tabela 12. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ STD e pelo método oficial.....	304
Tabela 13. Concentrações calculadas e lidas dos controles STD para a Curva de calibração 1.....	309
Tabela 14. Concentrações calculadas e lidas no segundo teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....	309
Tabela 15. Concentrações calculadas e lidas dos controles STD para a Curva de calibração 2.....	310
Tabela 16. Concentrações calculadas e lidas no segundo teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.....	310

Tabela 17. Resultados experimentais corrigidos, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ STD.....	311
Tabela 18. Correlação corrigida entre os valores médios de IP, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ STD e pela AOCS.....	312
Tabela 19. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ STD e pela AOCS.....	315
APÊNDICE G-2 – Resultados experimentais de IP de óleos vegetais refinados com o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	317
Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	317
Tabela 2. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY, amostras D a G, I a N.....	318
Tabela 3. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 1.....	318
Tabela 4. Curva de calibração 2 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY, amostras D a G, I a N.....	319
Tabela 5. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 2.....	319
Tabela 6. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY, amostras A a C, H, O a U.....	320
Tabela 7. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 1.....	320
Tabela 8. Curva de calibração 2 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY, amostras A a C, H, O a U.....	320
Tabela 9. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 2.....	321
Tabela 10. Resultados experimentais com o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	321
Tabela 11. Resultados experimentais de IP pelo método oficial.....	323
Tabela 12. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY e pela AOCS.....	325
APÊNDICE H-1 – Resultados experimentais de IP de óleos de soja com o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD: método modificado.....	327

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do <i>kit</i> PeroxySafe™ STD.....	327
Tabela 2. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD, amostras A a J....	328
Tabela 3. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....	329
Tabela 4. Curva de calibração 2 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD, amostras A a J....	329
Tabela 5. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.....	329
Tabela 6. Curva de calibração 3 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD, amostras A a J....	330
Tabela 7. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 3.....	330
Tabela 8. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD, amostras K a T...	330
Tabela 9. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....	331
Tabela 10. Resultados experimentais com o <i>kit</i> PeroxySafe™ STD.....	331
Tabela 11. Resultados experimentais de IP pelo método oficial modificado.....	333
Tabela 12. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ STD e pelo método oficial modificado.....	334
APÊNDICE H-2 – Resultados experimentais de IP de óleos refinados com o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY: método oficial modificado.....	337
Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	337
Tabela 2. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY, amostras A a J....	338
Tabela 3. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 1.....	339
Tabela 4. Curva de calibração 2 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY, amostras K a T...	339
Tabela 5. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 2.....	340
Tabela 6. Resultados experimentais com o <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY.....	340
Tabela 7. Resultados experimentais de IP pelo método oficial.....	42
Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY e pela AOCS.....	344

APÊNDICE I-1 – Resultados experimentais de concentração de alquenais e p-anisidina das amostras de óleos de fritura.....347

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o *kit* AlkalSafe™ STD, amostras A a J.....347

Tabela 2. Testes do controle AlkalSafe™ STD para a Curva de calibração 1.....348

Tabela 3. Curva de calibração 2 para o *kit* AlkalSafe™ STD, amostras K a T.....348

Tabela 4. Teste do controle AlkalSafe™ STD para a Curva de calibração 2.....348

Tabela 5. Resultados experimentais com o *kit* AlkalSafe™ STD.....349

Tabela 6. Concentrações de alquenais obtidas com o *kit* AlkalSafe™ STD, após a correção de cor.....350

Tabela 7. Resultados experimentais de p-anisidina.....352

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de concentração de alquenais, obtidos pelo *kit* AlkalSafe™ STD, e p-anisidina.....354

APÊNDICE I-2 – Resultados experimentais de concentração de malonaldeído e TBA das amostras de óleos de fritura.....357

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o *kit* AldeSafe™ STD, amostras A a L.....357

Tabela 2. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....358

Tabela 3. Curva de calibração 2 para o *kit* AldeSafe™ STD, amostras M a T.....358

Tabela 4. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.....358

Tabela 5. Resultados experimentais com o *kit* AldeSafe™ STD.....359

Tabela 6. Resultados experimentais de TBA.....360

Tabela 7. Tabela comparativa dos resultados experimentais de concentração de malonaldeído, obtidos pelo *kit* AdeSafe™ STD, e número de TBA.....362

APÊNDICE J-1 – Resultados experimentais do teor de gordura das rações.....363

Tabela 1. Teor de gordura, em %, obtido através de extração a frio, das amostras de ração.....363

APÊNDICE J-2 – Resultados experimentais de %AGL das amostras de ração.....365

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do <i>kit</i> AciSafe™ MSA.....	365
Tabela 2. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> AciSafe™ MSA, amostras A a H.....	366
Tabela 3. Teste dos controles MSA para a Curva de calibração 1.....	366
Tabela 4. Curva de calibração 2 para o <i>kit</i> AciSafe™ MSA, amostras J a S.....	366
Tabela 5. Teste dos controles MSA para a Curva de calibração 2.....	367
Tabela 6. Resultados experimentais com o <i>kit</i> AciSafe™ MSA.....	367
Tabela 7. Resultados experimentais com o <i>kit</i> AciSafe™ MSA, em base lipídica.....	369
Tabela 8. Resultados experimentais de %AGL pelo método oficial modificado.....	370
Tabela 9. Tabela comparativa dos resultados experimentais de %AGL, obtidos pelo <i>kit</i> AciSafe™ MSA e pelo método oficial modificado.....	372

APÊNDICE J-3 – Resultados experimentais de IP das amostras de ração.....375

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA, amostras A a H, K.....	375
Tabela 2. Teste dos controles MSA para a Curva de calibração 1.....	376
Tabela 3. Curva de calibração 2 para o <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA, amostras J, L a S.....	376
Tabela 4. Teste dos controles MSA para a Curva de calibração 2.....	377
Tabela 5. Resultados experimentais com o <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA.....	377
Tabela 6. Resultados experimentais com o <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA, em base lipídica.....	379
Tabela 7. Resultados experimentais de IP pelo método oficial modificado.....	380
Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, em base lipídica, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ MSA e pelo método oficial modificado.....	382

APÊNDICE J-4 – Resultados experimentais de concentração de alquenais e p-anisidina das amostras de ração.....385

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD, amostras A a L....	385
Tabela 2. Teste do controle AlkalSafe™ STD para a Curva de calibração 1.....	386
Tabela 3. Curva de calibração 2 para o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD, amostras M a S....	386
Tabela 4. Teste do controle AlkalSafe™ STD para a Curva de calibração 2.....	386
Tabela 5. Resultados experimentais com o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD.....	387
Tabela 6. Resultados experimentais com o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD, em base lipídica.....	388
Tabela 7. Resultados experimentais de p-anisidina.....	389
Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de concentração de alquenais, em base lipídica, obtidos pelo <i>kit</i> AlkalSafe™ STD, e p-anisidina.....	391

APÊNDICE J-5 – Resultados experimentais de concentração de malonaldeído e TBA das amostras de ração.....393

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o <i>kit</i> AldeSafe™ STD, amostras A, C, D e E.....	393
Tabela 2. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.....	394
Tabela 3. Curva de calibração 2 para o <i>kit</i> AldeSafe™ STD, amostras B, F, G, H, J a S.....	394
Tabela 4. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.....	394
Tabela 5. Resultados experimentais com o <i>kit</i> AldeSafe™ STD.....	395
Tabela 6. Resultados experimentais com o <i>kit</i> AldeSafe™ STD, em base lipídica.....	396
Tabela 7. Resultados experimentais de TBA.....	397

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de concentração de malonaldeído, em base lipídica, obtidos pelo *kit* AdeSafe™ STD, e número de TBA.....399

APÊNDICE K - Resultados experimentais da comparação de médias, através de ANOVA para %AGL de rações (*kit* AciSafe™ MSA).....401

Tabela 1. ANOVA para comparação de médias - *kit* AciSafe™ MSA.....401

Tabela 2. ANOVA para comparação de médias, aplicando o fator de correção de 1,20 para as determinações com o *kit* AciSafe™ MSA.....401

Tabela 3. ANOVA para comparação de médias, aplicando o fator de correção de 1,30 para as determinações com o *kit* AciSafe™ MSA.....402

Tabela 4. ANOVA para comparação de médias, aplicando o fator de correção de 1,40 para as determinações com o *kit* AciSafe™ MSA.....402

Tabela 5. ANOVA para comparação de médias, aplicando o fator de correção de 1,10 para as determinações com o *kit* AciSafe™ MSA.....403

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica.....	57
Figura 1. Efeitos da oxidação de lipídios.....	58
Figura 2. Algumas rotas de decomposição de hidroperóxidos.....	59
Figura 3. Exemplo de correlação positiva entre as variáveis x e y.....	66
Figura 4. Exemplo de correlação negativa entre as variáveis x e y.....	66
Figura 5. Exemplo de Regressão Linear com as bandas de confiança (BC) e de predição (BP).....	70
CAPÍTULO 2 - Correlação do teor de ácidos graxos livres de óleos vegetais avaliados por testes rápidos e pelo método oficial da AOCS.....	81
Figura 1. Fluxograma do procedimento das análises com os <i>kits</i> FaSafe™ para determinação do percentual de Ácidos Graxos Livres, de acordo com as informações do fabricante.....	87
Figura 2. Gráfico ilustrativo dos valores de AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo <i>kit</i> FaSafe™ STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 1 a 12 de azeites comerciais.....	89
Figura 3. Gráfico ilustrativo dos valores de AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo <i>kit</i> FaSafe™ STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 13 a 25 de azeites comerciais.....	89
Figura 4. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo <i>kit</i> FaSafe™ STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 1 a 12 de azeites comerciais.....	90
Figura 5. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo <i>kit</i> FaSafe™ STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 13 a 25 de azeites comerciais.....	90
Figura 6. Gráfico da correlação entre os valores de AGL de 25 amostras de azeites comerciais, em % ácido oléico, obtidos pelo <i>kit</i> FaSafe™ STD e pela metodologia	

AOCS Ca 5a-40, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....91

Figura 7. Diferença entre os valores de AGL, em %, obtidos pelo *kit* FaSafe STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40 para óleos brutos e degomados.....93

Figura 8. Gráfico da correlação entre os valores de AGL de 10 amostras de óleos brutos e degomados, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* FaSafeTM STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....94

Figura 9. Gráfico ilustrativo dos valores de AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* FaSafeTM HSY e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 1 a 15 de azeites de oliva.....96

Figura 10. Gráfico ilustrativo dos valores de AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* FaSafeTM HSY e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 16 a 31 de óleos vegetais refinados.....96

Figura 11. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo *kit* FaSafeTM HSY e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 1 a 15 de azeites de oliva.....97

Figura 12. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo *kit* FaSafeTM HSY e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 16 a 31 de óleos vegetais refinados.....97

Figura 13. Gráfico da correlação entre os valores de AGL de azeites e óleos vegetais refinados, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* FaSafeTM HSY e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....98

CAPÍTULO 3 – Determinação de peróxidos presentes em óleos vegetais através de kits rápidos e sua correlação com o método AOCS Cd 8b-90.....105

Figura 1. Fluxograma do procedimento das análises de determinação de peróxidos utilizando os *kits* PeroxySafeTM de determinação de Índice de Peróxido, segundo instruções do fabricante.....113

Figura 2. Gráfico ilustrativo dos valores de IP, em meq/kg, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ STD e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, em triplicada, para amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.....	115
Figura 3. Diferença, em %, entre os valores de índice de peróxido obtidos através do <i>kit</i> PeroxySafe™ STD e pelo método AOCS Cd 8b-90 para amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.....	116
Figura 4. Gráfico da diferença, em %, entre os métodos empregados e Índice de Peróxido, obtidos pela AOCS Cd 8b-90 para amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.....	116
Figura 5. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de azeites e óleos de soja vencidos, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ STD e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....	117
Figura 6. Gráfico ilustrativo dos valores de Índice de Peróxido, em meq/kg, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 para óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas.....	120
Figura 7. Diferença, em %, entre os valores de índice de peróxido, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 para amostras de óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas.....	120
Figura 8. Relação existente entre a diferença entre métodos, em %, Índice de Peróxido, obtidos pela AOCS Cd 8b-90, para amostras de óleos refinados.....	121
Figura 9. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....	122
CAPÍTULO 4 - Alterações no método oficial de determinação de peróxidos, baseado em iodometria, e sua correlação com kits rápidos.....	129

Figura 1. Diferença, em %, entre os valores de índice de peróxido obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ STD e pelo método AOCS Cd 8b-90 para amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.....	134
Figura 2. Diferença, em %, entre os valores de índice de peróxido, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 para amostras de óleos vegetais refinados.....	135
Figura 3. Relação entre a diferença relativa dos métodos AOCS Cd 8b-90 modificado e <i>kit</i> PeroxySafe™ STD, em %, e índice de peróxido obtido pelo método iodométrico.....	136
Figura 4. Relação entre a diferença relativa dos métodos AOCS Cd 8b-90 modificado e <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY, em %, e índice de peróxido obtido pelo método iodométrico.....	136
Figura 5. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de óleos de soja vencidos e azeites, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ STD e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 modificada, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....	137
Figura 6. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de óleos vegetais refinados, obtidos pelo <i>kit</i> PeroxySafe™ HSY e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 modificada, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....	138
CAPÍTULO 5 – Utilização de metodologias rápidas (<i>kits</i>) na avaliação do óleo de fritura do Restaurante Universitário.....	147
Figura 1. Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532 nm.....	153
Figura 2. Fluxograma do procedimento das análises com o <i>kit</i> AlkalSafe™ STD de quantificação de alquenais.....	161
Figura 3. Fluxograma do procedimento das análises com o <i>kit</i> AldeSafe™ STD de quantificação de malonaldeído.....	162

Figura 4. Gráfico da correlação entre as concentrações de alquenais, obtidas através do *kit* AlkalSafe™ STD, e valor de p-anisidina (AOCS Cd 18-90) para amostras de óleo de fritura, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....170

Figura 5. Gráfico da correlação entre as concentrações de malonaldeído, obtidas através do *kit* AldeSafe™ STD e TBA (AOCS Cd 19-90) para amostras de óleo de fritura.....174

CAPÍTULO 6 - Avaliação da qualidade de “pet foods” através de kits rápidos e métodos oficiais.....185

Figura 1. Sistema de filtração por membranas DiaMed F.A.T.S.....190

Figura 2. Gráfico ilustrativo dos valores de %AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* AciSafe™ MSA e pela metodologia AOCS Ca 5a-40 modificada, em triplicata, para amostras de ração.....196

Figura 3. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo *kit* AciSafe™ MSA e pela metodologia AOCS Ca 5a-40 modificada, em triplicata, para amostras de ração.....196

Figura 4. Gráfico da correlação entre os valores de %AGL de amostras de ração, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* AciSafe™ MSA e pela metodologia AOCS Ca 5a-40 modificada, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....197

Figura 5. Gráfico ilustrativo dos valores de IP, em meq/kg, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ MSA e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 modificada, em triplicata, para amostras de ração.....199

Figura 6. Diferença, em %, entre os valores de IP obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ MSA e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 modificada, em triplicata, para amostras de ração.....199

Figura 7. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de ração, em meq/kg, obtidos pelo *kit* PeroxiSafe™ MSA e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....200

Figura 8. Gráfico da correlação entre a concentração de alquenais obtida pelo *kit* AlkalSafe™ STD, em nmol/kg de lipídio, e os valores de anisidina de amostras de ração, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....205

Figura 9. Gráfico da correlação entre as concentrações de malonaldeído obtidas pelo *kit* AldeSafe™ STD, em nmol/kg, e os números de TBA de amostras de ração, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).....209

APÊNDICE G-1 – Resultados experimentais de IP de óleos de soja com o *kit* PeroxySafe™ STD.....297

Figura 1. Gráficos de correlação dos resultados obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela AOCS.....305

Figura 2. Curva de calibração 1 obtida para os valores de absorbância e concentração lidos.....307

Figura 3. Curva de calibração 2 obtida para os valores de absorbância e concentração lidos.....308

Figura 4. Gráfico da correlação dos valores médios de IP obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela AOCS para as amostras de azeites de oliva, utilizando a Curva de Calibração 1.....312

Figura 5. Gráfico da correlação dos valores médios de IP obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela AOCS para as amostras de azeites de oliva, utilizando a Curva de Calibração 1.....313

Figura 6. Gráfico da correlação entre os valores de IP médios obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela AOCS para as amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.....314

INTRODUÇÃO GERAL

Os sistema de testes de análises de alimentos DiaMed F.A.T.S. é composto por testes rápidos de análises (*kits*) destinados a avaliar a qualidade, condições para o consumo e/ou determinar a validade de óleos, gorduras e produtos que os contenham, foi desenvolvido com a finalidade de atender à demanda por métodos rápidos, sem a necessidade de laboratórios altamente equipados e quantidades significativas de amostra, com geração mínima de resíduos a serem tratados e que forneçam segurança ao funcionário que executa as análises.

A pequena área de trabalho requerida se deve ao emprego de equipamentos compactos e manipulação de pequenas quantidades de reagentes, não necessitando de grande infra-estrutura, como capelas e vastas áreas de bancadas. As análises são realizadas em tubos de ensaio, minimizando o espaço destinado aos materiais de laboratório e vidrarias de volumes significativos (balões volumétricos, *erlenmeyers*, béqueres, provetas, chapas de aquecimento, frascos de reagentes, etc.), utilizados nas análises convencionais.

A redução de resíduos gerados é estimada em 4 a 19 vezes a quantidade gerada pelos métodos convencionais, de acordo com o do tipo de análise, e essa quantidade pode ser ainda reduzida se um maior número de amostras for analisado nas mesmas condições (mesma curva de calibração e teste dos controles).

Para estudos de vida útil, a quantidade de amostra pode ser um fator limitante. Por exemplo, o método oficial da AOCS Ca 5a-40 requer de 3,5 a 56,4 g para uma única determinação de ácidos graxos livres, de acordo com a faixa de acidez do produto. Contabilizando as repetições para as determinações (duplicata, triplicata), a tomada de amostras ao longo do tempo e outras análises também necessárias (índice de peróxido, TBA, p-anisidina, composição em ácidos graxos, compostos polares, etc.), variando conforme o produto, o estudo pode se tornar custoso, devido à elevada quantidade de produto inicial e sua manutenção nas condições do estudo. Sendo assim, os *kits* constituem-se numa alternativa útil, tendo em vista que as quantidades de amostra variam de 50 a 150 μL para cada determinação.

Quanto ao aspecto de segurança do trabalho, as análises ditas de bancada muitas vezes submetem o laboratorista a riscos físicos (ruído, vibrações, temperaturas elevadas,

pressão, radiação, etc), químicos (uso de solventes, reagentes perigosos, substâncias fumegantes, etc.), biológicos (poeira e micro-partículas, microrganismos, etc.) e ergonômicos (má postura, desorganização do trabalho decorrente de elevado número de amostras, lesões por esforços repetitivos e doenças osteomusculares relacionadas ao trabalho – LER/DORT, trabalho em turnos, etc.). Tais riscos podem gerar acidentes de trabalho, resultando em lesões corporais e prejuízos econômicos à empresa, que podem vir a ser repassados ao consumidor. Aliado a isso, os *kits* substituem o reagente de p-anisidina e o ácido tiobarbitúrico, considerados, respectivamente, carcinogênico e provedor de efeitos alucinógenos, quando mal empregados.

Diante das vantagens dos *kits*, pouco foi estudado a respeito da sua correlação com os métodos oficiais, sendo que dois deles já são metodologias certificadas pela AOAC.

Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os *kits* que compõem o DiaMed F.A.T.S. para a predição da qualidade de óleos vegetais brutos e degomados, óleos refinados, azeites de oliva, óleos de fritura e rações e correlacionar os resultados obtidos pelos *kits* com os resultados fornecidos pelos métodos oficiais correspondentes da AOCS.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 OXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS

A oxidação de lipídios é a maior causa da deterioração dos alimentos. É de grande valor econômico na indústria de alimentos porque conduz ao desenvolvimento de diversos sabores e odores inaceitáveis em óleos comestíveis e produtos à base de gordura, comumente denominados ranços (FRANKEL, 1980; NAWAR, 1996; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). A aceitação do produto alimentício depende da extensão em que a deterioração ocorre (GRAY, 1978).

Pode, ainda, diminuir a qualidade nutricional dos alimentos, sendo que certos produtos de oxidação (Figura 1 e 2) são potencialmente tóxicos (NAWAR, 1996; FRANKEL, 1980). Exemplos de compostos que devem ser considerados incluem peróxidos e radicais livres, malonaldeído e diversos produtos da oxidação do colesterol, sendo que as doenças coronárias podem ser causadas pelo consumo de produtos da oxidação de lipídios (ADDIS, 1986).

Por outro lado, sob certas condições, em queijos e alguns alimentos fritos, um certo grau de oxidação de lipídios é desejável (NAWAR, 1996).

Embora a análise sensorial seja um dos métodos disponíveis mais sensíveis, não é prático para análises de rotina e geralmente é falho em termos de reprodutibilidade. Como consequência, vários métodos físicos e químicos têm sido desenvolvidos para quantificar a deterioração oxidativa, com o objetivo de correlacioná-la com os valores de “off-flavor” desenvolvidos (GRAY, 1978).

1.1 RANCIDEZ HIDROLÍTICA

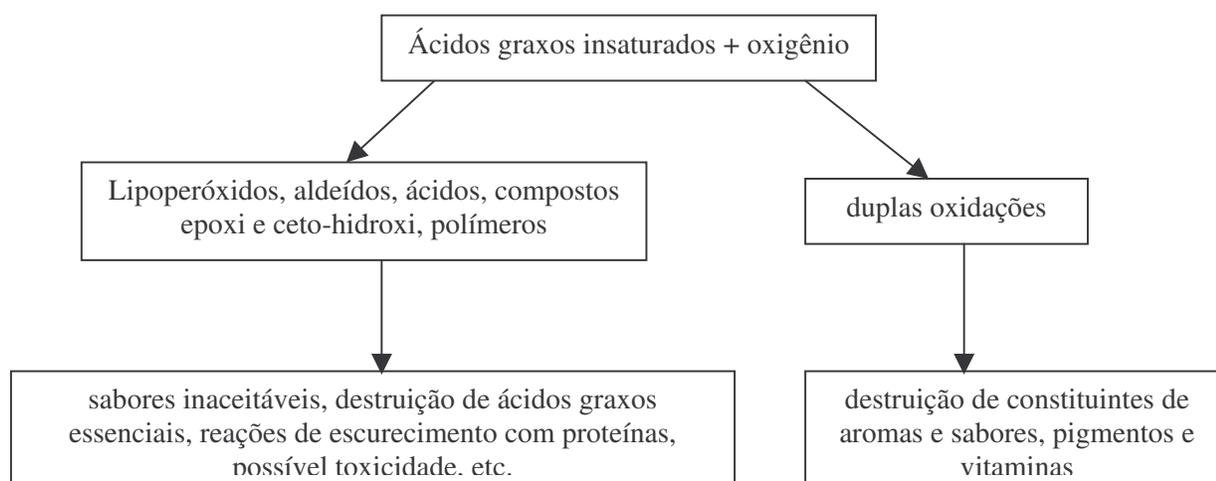
A rancidez hidrolítica é o processo que se traduz no aumento progressivo de ácidos graxos livres, por ação hidrolítica enzimática, a partir dos ácidos graxos liberados dos triglicerídios, fosfatídios e glicolipídios. A rancidez ocorre com maior facilidade em

alimentos com certa quantidade de água, condição que permite a hidrólise enzimática e contaminação bacteriana. As enzimas envolvidas são as lipases (fosfolipases e glicolípido-hidrolases), próprias do alimento ou de origem bacteriana. O processo hidrolítico pode provocar uma profunda modificação da fração lipídica, propiciando alterações sensoriais às vezes muito evidentes. No caso dos ácidos graxos serem voláteis, como ocorre com o ácido butírico, o produto da rancidez manteiga, eles também contribuem no sabor característico de queijos (PIÑOL; BORONAT, 1989).

1.2 RANCIDEZ OXIDATIVA

A autoxidação de lipídios é bastante complexa e envolve um grande número de reações de intermediários interligadas. A taxa de autoxidação varia consideravelmente e é afetada pela composição em ácidos graxos, grau de insaturação, presença e atividade de pro e antioxidantes, pressão parcial de oxigênio, natureza da superfície exposta ao oxigênio e condições de estocagem (temperatura, exposição à luz, teor de umidade, etc) dos alimentos com óleo ou gordura em sua composição (BELITZ, GROSCH, 1999).

A autoxidação é conduzida entre o oxigênio atmosférico e um composto orgânico, geralmente um composto insaturado, à temperatura ambiente (Figura 1).

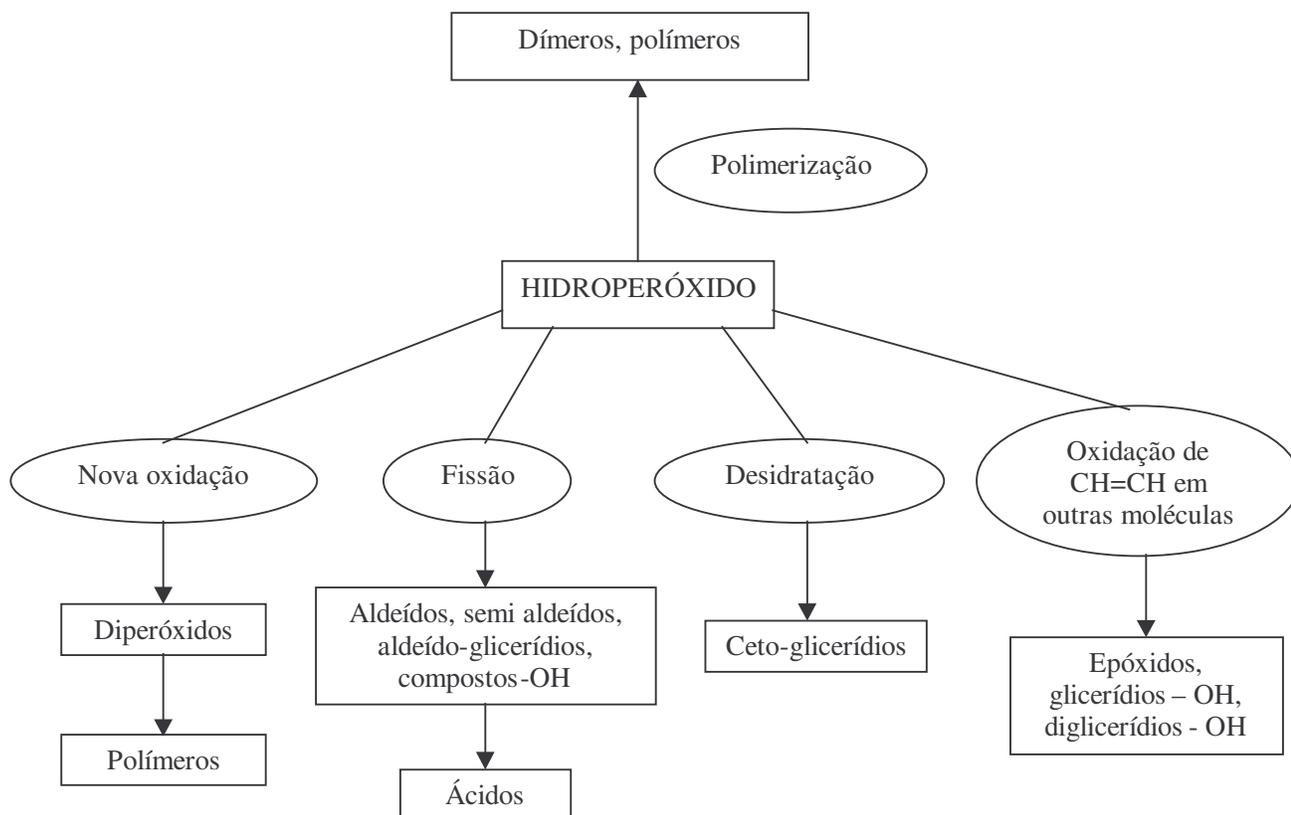


Fonte: Lea (1962, p. 4).

Figura 1. Efeitos da oxidação de lipídios.

A complexidade da reação tem sido revelada até um certo limite e grande parte dos detalhes da reação e suas conseqüências permanecem desconhecidas. A reação é geralmente acelerada por íons metálicos e luz e inibida por uma variedade de compostos químicos, denominados antioxidantes (CHAN, 1987).

A Figura 2 apresenta algumas rotas da decomposição dos hidroperóxidos formados.

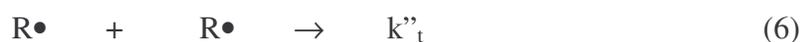
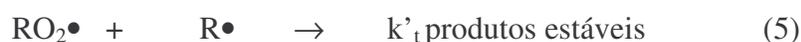
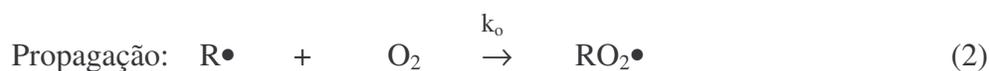


Fonte: Lea (1962, p. 5).

Figura 2. Algumas rotas de decomposição de hidroperóxidos.

A autoxidação pode ser dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação (GRAY, 1978; FRANKEL, 1980; PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995), segundo as equações 1 a 6.





A iniciação é talvez a etapa mais difícil de ser definida, devido à pequena concentração de radicais e à probabilidade de existir mais de um processo, já que um grande número de radicais diferentes pode retirar o hidrogênio do RH para formar $R\bullet$. O elemento $X\bullet$ pode ser um íon metálico de transição, um radical gerado por fotólise ou elevada energia de irradiação, um radical obtido pela decomposição de um hidroperóxido ($RO\bullet$) ou um radical formado a partir de um iniciador adicionado, o α,α -azobisisobutironitrila ou AIBN (CHAN, 1987).

É pouco provável que a iniciação ocorra pelo ataque direto do oxigênio em sua forma mais estável (estado *triplet*) na dupla ligação dos ácidos graxos (RH). A explicação mais aceita é que o oxigênio *singlet*, a espécie ativa na deterioração fotooxidativa, é o responsável pela iniciação (ALLEN, 1978 apud NAWAR, 1996).

No processo de propagação, k_o é a constante da taxa de oxigenação e a reação 2 é rápida. A etapa mais importante cineticamente e determinante da taxa de oxidação é a segunda reação (reação 3), dada pela constante k_p . Embora existam três etapas de terminação, a pressões parciais normais de oxigênio (aproximadamente 100 mmHg), a reação $R\bullet + O_2 \rightarrow RO_2\bullet$ é tão rápida que as reações de terminação envolvendo $R\bullet$ não são importantes e $RO_2\bullet + RO_2\bullet \rightarrow k_t$ é a única etapa significativa da terminação (CHAN, 1987).

2 KITS

Os kits DiaMed F.A.T.S. foram empregados em alguns estudos divulgados em congressos internacionais:

- em óleos utilizados em *snacks* e na determinação da vida-de-prateleira destes, através de determinações de índice de peróxidos, malonaldeído, alquenais e ácidos graxos livres (GORDON, 2000);
- em matérias-primas e produtos finais de panificação e produtos fritos, tais como *chips*, *cookies*, óleos, sementes, farinha, determinando índice de peróxidos, malonaldeído, alquenais e ácidos graxos livres (GORDON et al., 2001b);
- na avaliação de qualidade e estabilidade de formulações infantis e suas matérias-primas, através de índice de peróxidos, alquenais, malonaldeído e ácidos graxos livres (GORDON et al., 2001c; GORDON, 2001a; 2002c);
- em determinações de peróxidos, alquenais e ácidos graxos livres em óleos refinados de soja, milho e girassol (GORDON, 2002a);
- em determinações de peróxidos e alquenais em sementes, pasta de amendoim e barras nutricionais (GORDON, 2002b);
- em sua validação, utilizando *snacks*, refeições, cereais e óleos. A reprodutibilidade obtida foi de $R^2 = 0,99$ e a correlação com os métodos tradicionais, $R^2 = 0,97 - 0,99$ (GORDON, 2001b; GORDON et al., 2001a); e,
- na correlação com os métodos oficiais de peróxidos e ácidos graxos livres, utilizando azeites e óleos vegetais refinados, obtendo valores de $R^2 = 0,95 - 0,97$ (OSAWA et al., 2003).

Embora os kits FaSafe™ STD e Peroxy Safe™ STD tenham sido reconhecidos como métodos certificados pela AOAC (SAFTEST, 2003a; 2003b), a literatura carece de estudos, tanto de divulgação como comprobatórios de sua validade, baseados em análises estatísticas. Até o presente, foi encontrado um único estudo publicado em periódico internacional, empregando o *kit* referente a peróxidos em estudos de oxidação de óleos de soja induzida por fonte luminosa (YILDIZ; WEHLING; CUPPETT, 2003).

2.1 Kits DiaMed F.A.T.S.

DiaMed F.A.T.S. é composto por *kits* alternativos a 4 métodos analíticos: ácidos graxos livres, índice de peróxidos, teste de TBA e p-anisidina, e pode ser aplicado a um amplo espectro de materiais, desde óleos refinados a matrizes complexas (carnes, peixes, órgãos frescos e rações em geral).

À exceção dos *kits* para determinação de malonaldeído e alquenais, os demais são classificados em 3 grupos (HSY, STD e MSA) dependendo da faixa de detecção dos *kits*, conforme descrito a seguir. O princípio da análise permanece o mesmo para o mesmo grupo, isto é, para o mesmo tipo de análise. A preparação da amostra e extração dos lipídios é o fator que varia, de acordo com os parâmetros a serem medidos.

Todos os *kits* partem do princípio colorimétrico de análises, economizando tempo e reagentes, se comparados aos métodos convencionais.

2.2 Princípios das análises

a) Ácidos Graxos Livres (FFA) – *kits* FaSafe™ ou AciSafe™

O método é baseado no pH, que modifica a cor do indicador, e os resultados são expressos em % de ácido oléico.

b) Índice de Peróxidos – *kits* PeroxySafe™

O método é baseado na medição da oxidação do ferro acidificado, mediada pelo hidroperoxido, com resultados em meq/kg de óleo.

c) Malonaldeído (alternativo ao teste de TBA) – *kits* AldeSafe™

O método é baseado na quantificação do complexo colorido formado entre o malonaldeído e o indol, como indicador da degradação oxidativa secundária. Os resultados são expressos em nmol/mL ou nmol/kg (*kit* STD) ou $\mu\text{mol/mL}$ (*kit* MSA), dependendo da classificação dos *kits*.

d) Alquenais (alternativo ao teste de p-anisidina) – kits AlkalSafe™

O método é baseado na quantificação do complexo colorido formado entre o malonaldeído e o indol, como indicador da degradação oxidativa secundária. Os resultados são expressos em nmol/mL ou nmol/kg (*kit* STD) ou $\mu\text{mol/mL}$ (*kit* MSA), dependendo da classificação dos *kits*.

Apesar de possuírem o mesmo princípio, os *kits* AlkalSafe™ e AldeSafe™ diferem quanto ao tempo de reação, os controles e calibradores.

2.3 Classificação dos kits**a) Kits de alta sensibilidade (“high sensitivity”) - HSY**

Especialmente produzidos para óleos refinados e produtos similares, onde o material do teste é líquido, puro, ou para materiais onde são esperadas baixas concentrações. Os testes são realizados diretamente no material, sem a necessidade de extração de lipídios.

b) Kits padrão (“standard”) – STD

Destinados a óleos prensados e refinados, azeites de oliva, óleos de soja e girassol. Podem também ser utilizados para matrizes simples, tais como grãos, sementes, nozes, “chips”, alimentos fritos, biscoitos, farinhas e molhos, requerendo a extração dos lipídios antes das análises.

c) Kits para matrizes complexas (“matrix special applications”) – MSA

São utilizados para carnes, rações em geral, peixes, alimentos e órgãos frescos, etc. e necessitam da extração de lipídios antes das análises.

A Tabela 1 relaciona os *kits* existentes, tipos de análises e produtos em que podem ser empregados.

Tabela 1. Aplicações dos *kits* Diamed F.A.T.S., de acordo com o produto a ser analisado.

Análise	Óleos refinados	Óleos prensados, de frituras, e matrizes simples	Matrizes complexas
AGL	FaSafe™ HSY	FaSafe™ STD	AciSafe™ MSA
Peróxido	PeroxySafe™ HSY	PeroxySafe™ STD	PeroxySafe™ MSA
Malonaldeído	AldeSafe™ STD	AldeSafe™ STD	AldeSafe™ MSA
Alquenais	AlkalSafe™ STD	AlkalSafe™ STD	AlkalSafe™ MSA

As faixas de detecção dos *kits* estão ilustradas na Tabela 2. Para amostras com valores excedentes a essas faixas, é permitida a diluição das amostras com o reagente apropriado.

Nota-se que para os *kits* MSA, os resultados são expressos em unidades de massa da matriz, enquanto que para os *kits* STD e HSY, os resultados se referem ao volume de lipídio analisado.

Tabela 2. Faixa de detecção dos *kits* Diamed F.A.T.S.

Kit	Faixa de detecção
FaSafe™ STD	0,2 a 2,2 % ác. oléico
FaSafe™ HSY	0,02 a 0,2% ác. oléico
AciSafe™ MAS	0,2 a 2,2 % ác. oléico
PeroxySafe™ STD	0,01 a 0,55 meq/kg
PeroxySafe™ HSY	0,01 a 0,22 meq/kg
PeroxySafe™ MSA	0,01 a 0,22 meq/kg
AldeSafe™ STD	0 a 55 nmol/mL
AldeSafe™ MSA	0 a 11 nmol/mL
AlkalSafe™ STD	7 a 77 µmol/mL
AlkalSafe™ MSA	7 a 77 µmol/kg

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.1 REGRESSÃO LINEAR E ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

A análise de regressão é a ferramenta estatística mais amplamente utilizada para investigar e modelar a relação entre variáveis. As aplicações da regressão são numerosas e ocorrem em quase todas as áreas, incluindo engenharia, ciências exatas, econômicas, administrativas, biológicas, médicas e sociais. Utilizam-se modelos de regressão para diversos propósitos, incluindo a descrição de dados, estimativa de parâmetros, estimativa e predição e controle.

Entende-se por Regressão Linear Simples a equação do tipo $y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$, onde x é a variável independente, y , a variável dependente e ε , o erro estatístico ou resíduo, uma variável aleatória que leva em consideração a possibilidade do modelo falhar no exato ajuste dos dados (MONTGOMERY; PECK, 1992; DRAPER; SMITH, 1981).

A Análise de Regressão é utilizada para especificar o valor dos coeficientes da função de regressão, denominados β_0 e β_1 . A Função da Regressão ou Linha de Regressão é a linha da relação média entre duas variáveis e indica o valor médio de y associado com um valor particular de x .

O objetivo de correlacionar metodologias de análises químicas é avaliar a extensão na qual a covariação existe entre as variáveis sob investigação. Duas variáveis são ditas correlacionadas quando uma mudança no valor de uma das variáveis tende a ser associada com uma mudança consistente correspondente ao valor da outra (BHATTACHARYYA; JOHNSON, 1977; DRAPER; SMITH, 1981; MONTGOMERY; PECK, 1992).

Existe uma boa correlação quando a relação é tão forte que quase se prediz o valor de uma das variáveis, dado o valor da outra. Uma boa correlação está associada com a situação na qual os valores observados das variáveis se encontram muito próximos à linha de regressão. Em contrapartida, uma pobre correlação está associada a valores dispersos em relação à linha de regressão.

Correlação positiva ou direta: duas variáveis estão positivamente ou diretamente correlacionadas se y tende a aumentar quando x cresce, isto é, quando pequenos valores de

y estão associados a pequenos valores de x e valores elevados de y, a elevados valores de x, o que pode ser visualizado na Figura 3 (DRAPER; SMITH, 1981; COSTA NETO; 1992).

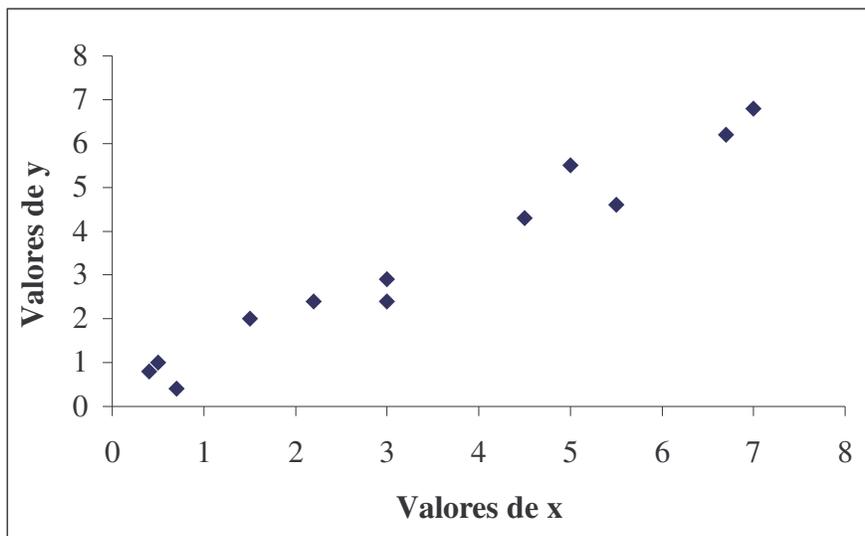


Figura 3. Exemplo de correlação positiva entre as variáveis x e y.

Correlação negativa ou inversa: ocorre quando y tende a diminuir quando x aumenta (Figura 4), isto é, pequenos valores de x tendem a estar associados com elevados valores de y e elevados valores de x, a pequenos valores de y (DRAPER; SMITH, 1981; COSTA NETO; 1992).

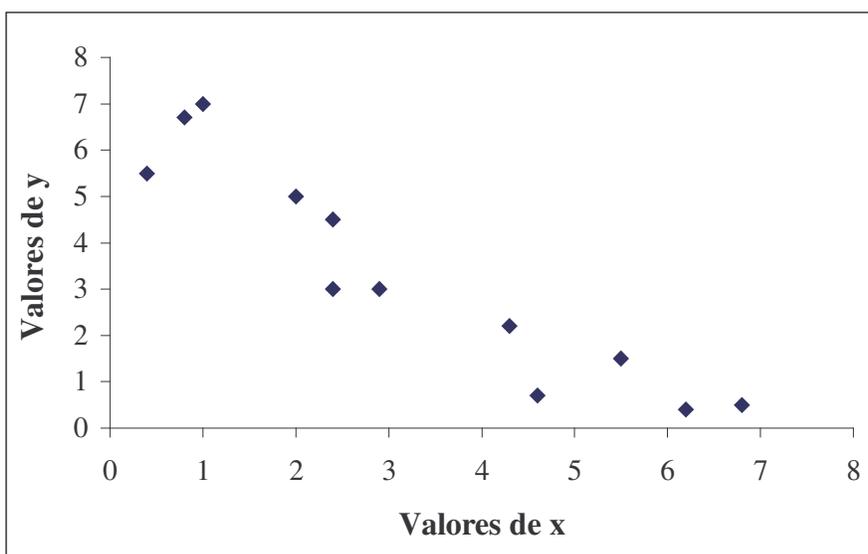


Figura 4. Exemplo de correlação negativa entre as variáveis x e y.

Os termos correlação negativa e correlação positiva não são indicativos de bom ou ruim, mas indicam a direção da relação (inversa ou direta) (PARSONS, 1974).

3.2 COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR

Um tipo de associação entre as variáveis x e y produz pares de valores ou, graficamente, pontos que se distribuem ao redor da reta. Uma pequena quantidade de pontos dispersos ao redor da reta indica forte associação, ao passo que grandes quantidades de pontos dispersos é uma manifestação de associação pobre. A medida numérica dessa relação é denominada coeficiente de correlação linear (r) e é dada pela equação 7:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2] \cdot [\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (7)$$

onde $(x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ são os n pares de observações.

O valor de r varia de -1 a 1 . O valor de $r = 1$ ocorre apenas quando todos os pontos estão perfeitamente ajustados na reta com uma inclinação positiva; $r = -1$ é também uma relação linear perfeita em que a inclinação é negativa. O valor $r = 0$ é interpretado como ausência de relação linear.

A proporção de variação dos valores de y que pode ser explicada pela relação linear é precisamente R^2 , também denominado coeficiente de determinação. Dessa forma, para $r = 0,9$, o valor de R^2 é $0,81$, significando que 81% da variação nos valores de y podem ser explicados pela relação linear e para $r = 0,5$, apenas 25% é explicado (DRAPER; SMITH, 1981).

3.3 MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS

O Método dos Mínimos Quadrados é um método objetivo e eficiente de estimar os parâmetros da regressão do modelo $y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i$, onde ε_i é o erro, de média zero e variância desconhecida, isto é, $\varepsilon_i = N(0, \sigma^2)$.

Suponha que uma reta arbitrária $y = \beta_0 + \beta_1 x$ é traçada de forma a correlacionar y a x . No valor x_i da variável controlada, o valor de y predito pela reta é $a + b x_i$ (denotado por \hat{y}_i), enquanto que o valor observado de y é y_i . A discrepância d_i entre esses valores é calculada por $d_i = (y_i - \beta_0 - \beta_1 x_i)$, que é a distância vertical do ponto à reta.

Considerando tais discrepâncias de todos os n pontos, tem-se a equação 8 como medida de discrepância dos pontos observados da reta ajustada, onde a magnitude D depende da reta traçada. Em outras palavras, depende de a e b , as duas grandezas que determinam a reta.

$$D = \sum_{i=1}^n d_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \beta_0 - \beta_1 x_i)^2 \quad (8)$$

Um bom ajuste possui o valor de D mínimo possível, isto é, deve obedecer às condições dadas pelas equações (9) e (10) para a estimativa dos parâmetros $\hat{\beta}_0$ e $\hat{\beta}_1$.

$$\left. \frac{\partial S}{\partial \beta_0} \right|_{\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1} = -2 \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{\beta}_0 - \hat{\beta}_1 x_i) = 0 \quad (9)$$

e

$$\left. \frac{\partial S}{\partial \beta_1} \right|_{\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1} = -2 \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{\beta}_0 - \hat{\beta}_1 x_i) \cdot x_i = 0 \quad (10)$$

Sendo assim, o Método dos Mínimos Quadrados consiste na determinação dos valores dos parâmetros desconhecidos β_0 e β_1 , dados por $\hat{\beta}_0$ e $\hat{\beta}_1$, respectivamente, de forma a minimizar a discrepância geral (D), definida como o quadrado da diferença entre a

resposta observada e a resposta predita (BHATTACHARYYA; JOHNSON, 1977; DRAPER; SMITH, 1981).

3.4 BANDAS DE CONFIANÇA E BANDAS DE PREDIÇÃO

O intervalo de confiança fornece informações sobre a precisão das estimativas, no sentido de que quanto menor a amplitude do intervalo, maior a precisão. Se calculados os intervalos de confiança para alguns valores de x , é possível esboçar uma região em torno da reta estimada, indicando os limites superiores e inferiores desse intervalo. Essa região é chamada de **Bandas de Confiança**.

A amplitude do intervalo de confiança pode ser calculada através da equação 11.

$$2t_{(0,5-\alpha,n-2)} \sqrt{\sigma^2 \left(\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)}, \text{ onde } S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (11)$$

Já as **Bandas de Predição** compreendem o intervalo entre os limites superior e inferior dos intervalos de predição para alguns valores de x . Como o próprio nome indica, os intervalos de predição são valores de y não observados, correspondentes a valores observados de x .

A amplitude do intervalo de predição é dada pela equação 12.

$$2t_{(0,5-\alpha,n-2)} \sqrt{\sigma^2 \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)} \quad (12)$$

O intervalo de predição tem amplitude maior que o intervalo de confiança para um mesmo nível α e para um mesmo valor de x (Figura 5).

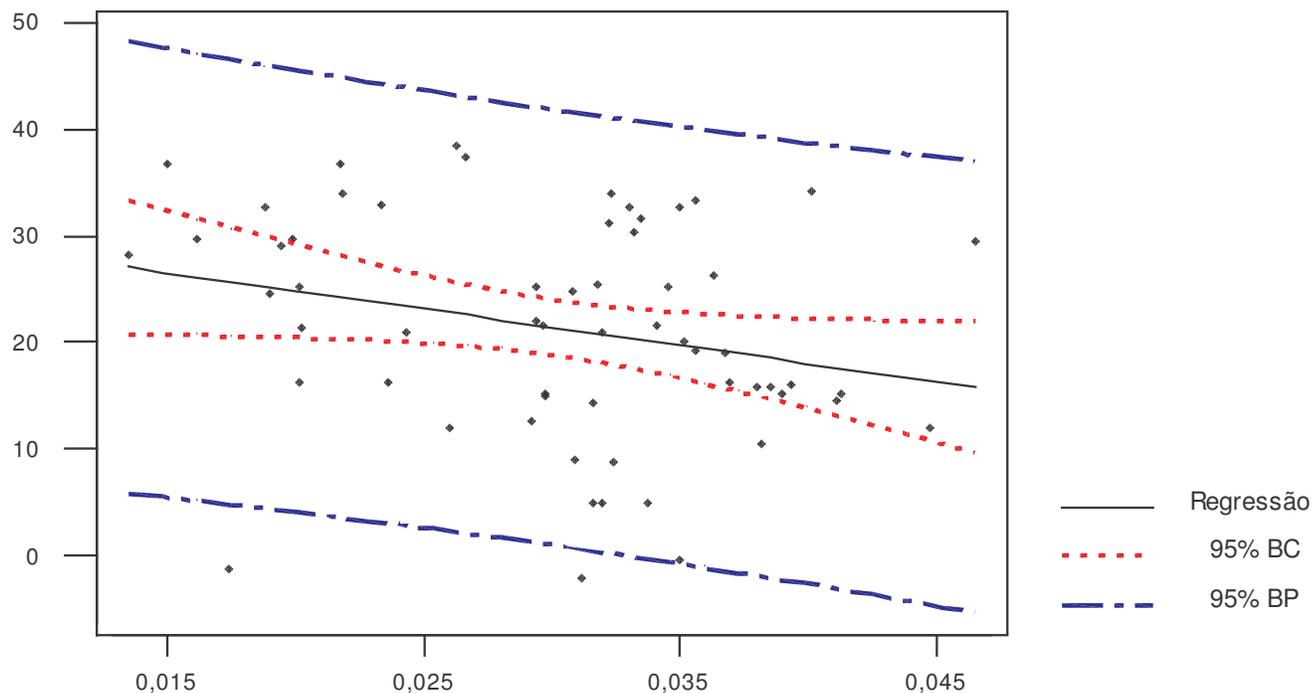


Figura 5. Exemplo de Regressão Linear com as bandas de confiança (BC) e de predição (BP).

Tanto as bandas de predição como as bandas de confiança têm formato de hipérbole, o que enfatiza o risco de se fazer extrapolações, ou seja, predições fora do intervalo observado de x . Dessa forma, os modelos de regressão devem ser usados com cautela para se fazer previsões sobre a variável resposta (MONTGOMERY; PECK, 1992; CHARNET et al, 1999).

3.5 AVALIAÇÃO DO MODELO

É necessário examinar o ajuste do modelo de regressão para garantir que ele propicie uma aproximação adequada do sistema real e verificar que nenhuma das hipóteses de regressão dos mínimos quadrados tenha sido violada. O modelo para a predição ou estimativa irá gerar resultados pobres ou duvidosos, a menos que o modelo tenha sido ajustado adequadamente (MYERS; MONTGOMERY; VINING, 2002).

Para a avaliação do modelo, testam-se as hipóteses:

$$H_0: \beta_1 = 0 \text{ e } H_1: \beta_1 \neq 0$$

Essas hipóteses testam a contribuição da variável regressora x para explicar a resposta y , uma vez que se H_0 for verdadeira, isto é, se $\beta_1 = 0$, essa contribuição não é significativa. Nesse caso, ou o modelo de reta não é adequado ou a variável regressora escolhida não contribui na explicação da variável y .

A hipótese H_0 é rejeitada se o valor numérico de F_{calc} obtido pela equação 13 for superior a ${}_1F_{(n-2)}(\alpha)$, o quantil $(1-\alpha)$ de distribuição F com 1 e $(n - 2)$ graus de liberdade (F_{tab}).

$$F_{\text{Calc}} = \frac{SQM_R}{SQM_E} = \frac{\beta_1^2}{\sigma^2} = \frac{\beta_1^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (13)$$

A Tabela 3, denominada Tabela de Análise de Variância (ANOVA), apresenta as grandezas necessárias para calcular o valor observado da estatística do teste F para n observações.

Tabela 3. Tabela de ANOVA para o teste de significância da regressão.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (SQM)	F_{Calc}
Regressão	$SQ_R = \hat{\beta}_1 S_{xy}$	1	SQ_R	SQM_R / SQM_E
Resíduo	$SQ_E = S_{yy} - \hat{\beta}_1 S_{xy}$	$n - 2$	$SQ_E / (n - 2)$	
Total	$SQ_T = S_{yy}$	$n - 1$		

$$\text{Onde: } \hat{\beta}_1 = \frac{\sum_{i=1}^n y_i x_i - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)(\sum_{i=1}^n x_i)}{n}}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}};$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n y_i (x_i - \bar{x}); e,$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n y_i^2 - n\bar{y}^2$$

Alternativamente, rejeita-se H_0 se o valor de p (probabilidade de uma variável aleatória com distribuição F , com 1 e $(n-2)$ graus de liberdade, ser maior do que o valor observado F_{Calc}) for muito pequeno. O valor de p é o menor valor possível de α que levaria à rejeição de H_0 . Seguindo esse raciocínio, para um valor de p de 0,15, a hipótese H_0 seria rejeitada somente para valores de α maiores ou iguais a 0,15 (CHARNET et al., 1999).

3.6 ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS

De modo análogo ao item 3.5, a ANOVA pode ser utilizada para se testar a hipótese de K tratamentos ou diferentes níveis de um único fator serem iguais ($H_0: \beta_1 = \dots = \beta_n = 0$ e $H_i: \beta_i \neq \beta_j$ para $i \neq j$).

A hipótese nula é rejeitada se satisfeita a condição expressa na equação 14.

$$F_{Calc} = \frac{SQM_{trat}}{SQM_E} > F_{\alpha, K-1, N-K} \quad (14)$$

A Tabela de ANOVA é ilustrada na Tabela 4 (BHATTACHARYYA; JOHNSON, 1977), sendo N o número de observações e K , o número de tratamentos.

Tabela 4. Tabela de ANOVA para comparação entre tratamentos.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (SQM)	F _{Calc}
Tratamentos	SQ _{trat}	K - 1	SQ _R /(K - 1)	SQM _{trat} / SQM _E
Resíduo	SQ _E	N - K	SQ _E /(N-K)	
Total	SQ _T	N - 1		

$$\text{Onde: } SQ_{\text{trat}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k y_i^2 - \frac{y_{..}^2}{N}$$

$$SQ_E = SQ_T - SQ_{\text{trat}}$$

$$SQ_T = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{N} \text{ e os valores de } y_i, y_{..} \text{ e } y_{ij} \text{ são dados pela Tabela 5.}$$

Tabela 5. Tabela típica de dados para experimentos de fator único.

Tratamento	Observações				Total	Média
1	y ₁₁	y ₁₂	. . .	y _{1n}	y _{1.}	$\bar{y}_{1.}$
2	y ₂₁	y ₂₂	. . .	y _{2n}	y _{2.}	$\bar{y}_{2.}$
.
.
.		y _{K.}	$\bar{y}_{K.}$
K	y _{K1}	y _{K2}	. . .	y _{Kn}	y _{..}	$\bar{y}_{..}$

3.7 COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DE DIFERENTES TRATAMENTOS

Após realizado o teste de ANOVA e uma vez rejeitada a hipótese nula, constata-se que existe diferença significativa entre as médias dos tratamentos, mas exatamente quais médias diferem não é especificado. Em determinadas situações, deseja-se comparar e analisar as médias entre os grupos de tratamentos. As comparações entre as médias dos

tratamentos são feitas em termos dos totais de tratamento ou das médias dos tratamentos e são denominadas Métodos de Comparação Múltipla (MONTGOMERY, 1997).

3.7.1 TESTE DE TUKEY

O teste de Tukey é um dos Métodos de Comparação Múltipla. Requer o uso de $q_{\alpha}(K, GL_E)$ para determinar o valor crítico para todas as comparações pareadas de médias dos tratamentos. No teste, duas médias são diferentes significativamente se o valor absoluto da diferença entre as amostras exceder o valor crítico calculado T_{α} pela equação 15 (MONTGOMERY, 1997).

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(K, GL_E) S_{\hat{y}_i}, \text{ onde } S_{\hat{y}_i} = \sqrt{\frac{SQM_E}{N}} \text{ e } N = \text{número de repetições} \quad (15)$$

3.8 EXEMPLO DE APLICAÇÃO DA ANOVA PARA COMPARAÇÃO DE TRATAMENTOS E TESTE DE TUKEY

Para ilustrar a utilização da Análise de Variância em estudos de caso, tem-se o seguinte exemplo, adaptado de Moraes (1993).

Da análise sensorial de cinco tipos de “hamburger”, preparados com 0; 5; 10; 15 e 20% de proteína de soja, deseja-se saber se os provadores percebem diferenças no sabor. As notas sensoriais variavam de 1 a 9 e estão reunidas na Tabela 6.

Tabela 6. Notas sensoriais dos provadores para os 5 níveis de adição de proteína de soja a “hamburger” e a somatória das notas.

Provador	0% (A)	5% (B)	10% (C)	15% (D)	20% (E)	Total
1	1	3	5	1	9	19
2	3	3	1	7	5	19
3	7	3	4	4	7	25
4	1	3	5	4	9	22
5	6	5	3	2	5	21
6	4	3	2	7	9	25
7	1	1	3	3	8	16
8	2	2	1	1	2	8
9	2	2	3	2	5	14
10	5	5	3	5	6	24
11	3	3	5	5	7	23
12	3	3	1	5	1	13
13	3	1	5	3	3	15
14	7	2	1	3	9	22
15	5	5	3	5	6	24
16	5	7	7	3	9	31
Total	58	51	52	60	100	321
Média	3,62	3,18	3,25	3,75	6,25	-

3.8.1 ANOVA

A seguir, apresenta-se o desenvolvimento dos cálculos para a ANOVA.

a) Soma dos Quadrados:

$$SQ_{trat} = \frac{(58)^2 + (51)^2 + (52)^2 + (60)^2 + (100)^2}{16} - \frac{321^2}{16 * 5} = 1391,81 - 1288,01 = 103,80$$

$$SQ_{prov} = \frac{(19)^2 + (19)^2 + (25)^2 + (21)^2 + \dots + (24)^2 + (31)^2}{5} - \frac{321^2}{16 * 5} = 1386,60 - 1288,01 = 98,59$$

$$SQ_T = (1)^2 + (3)^2 + (5)^2 + (1)^2 + (9)^2 + \dots + (7)^2 + (3)^2 + (9)^2 - \frac{321^2}{16 * 5}$$

$$SQ_T = 1667,00 - 1288,01 = 378,99$$

$$SQ_E = SQ_T - SQ_{\text{trat}} - SQ_{\text{prov}} = 378,99 - 103,08 - 98,59$$

$$SQ_E = 177,32$$

b) Graus de liberdade:

$$GL_{\text{trat}} = 5 - 1 = 4$$

$$GL_{\text{prov}} = 16 - 1 = 15$$

$$GL_E = 80 - 5 = 60$$

$$GL_T = 80 - 1 = 79$$

Na Tabela 7, estão relacionados os resultados da Análise de Variância para o caso estudado.

Tabela 7. Tabela de ANOVA do exemplo estudado.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (SQM)	F _{Calc}
Tratamentos	103,80	4	25,95	8,78
Provadores	98,59	15	6,57	
Resíduo	177,32	60	2,95	
Total	378,99	79		

$$F_{\text{Tab}} = F_{\alpha, K-1, N-K} = F_{5\%, 4, 78} \approx 2,50$$

Como $F_{\text{Calc}} > F_{\text{Tab}}$, existe diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de significância.

3.8.2 TESTE DE TUKEY

Aplicando as fórmulas para o cálculo do valor crítico (T_α), tem-se:

$$S_{\hat{y}_i} = \sqrt{\frac{SQM_E}{N}} = \sqrt{\frac{2,95}{16}} = 0,43$$

$$q_{\alpha}(K, GL_E) = q_{0,05}(5, 75) \approx 2,07$$

$$T_{0,05} = 1,89$$

Da Tabela 8, conclui-se que, ao nível de 5% de significância, a amostra E (20% proteína de soja) diferiu de todas as amostras (diferenças entre as médias das amostras, em valor absoluto, superiores ao valor crítico T_{α}) e as demais amostras não diferiram entre si.

Tabela 8. Diferença entre os valores médios das amostras (Teste de Tukey).

Média	Tratamento	A	B	C	D	E
3,62	0% (A)	-	0,44	0,37	-0,13	-2,63
3,18	5% (B)	-	-	-0,07	-0,57	-3,07
3,25	10% (C)	-	-	-	-0,50	-3,0
3,75	15% (D)	-	-	-	-	-2,5
6,25	20% (E)	-	-	-	-	-

4 REFERÊNCIAS

ADDIS, P. B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 24, n. 10/11, p. 1021-1030, 1986.

ALLEN, R. R. Principles and catalysts for hydrogenation of fats and oils. **Journal of American oil chemists' society**, v. 55, p. 792-795, 1978 apud NAWAR, W.W. Lipids. In FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p 225-320.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2. ed. Berlin: Springer, 1999. cap. 3, p. 152-235.

BHATTACHARYYA, G. K.; JOHNSON, R. A. **Statistical concepts and methods**. New York: John Wiley, 1977. cap. 10, p. 334-367.

CHAN, H. W. S. The mechanism of autoxidation. In: _____ (Ed.). **Autoxidation of unsaturated lipids**. London: Academic, 1987. p 1-16.

CHARNET, R. et al. **Análise de modelos de regressão linear**. Campinas: Editora da Unicamp, 1999. 356 p.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. 12. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1992. 264 p.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 2. ed. New York: John Wiley, 1981. 709 p.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, p. 1-22, 1980.

GORDON, V. C. et al. Analysis of total fat and lipid oxidation in complex food matrices. In: AOCS ANNUAL MEETING & EXPO ABSTRACTS, 92, 2001a, Minneapolis. **Anais eletrônicos...** Minneapolis, 2001. Disponível em: <<http://www.aocs.org/archives/am2001pp.htm>>. Acesso em: 21 ago. 2003. 11h41min.

_____. et al. Oxidative degradation and stability of fried and baked products using membrane separation technology. In: AOCS ANNUAL MEETING & EXPO ABSTRACTS, 92, 2001b, Minneapolis. **Anais eletrônicos...** Minneapolis, 2001. Disponível em: <<http://www.aocs.org/archives/am2001pp.htm>>. Acesso em: 21 ago. 2003. 11h41min.

_____. et al. Rapid assessment of oxidative degradation and stability using membrane separation technology. In: AOCS ANNUAL MEETING & EXPO ABSTRACTS, 92, 2001c, Minneapolis. **Anais eletrônicos...** Minneapolis, 2001. Disponível em: <<http://www.aocs.org/archives/am2001pp.htm>>. Acesso em: 21 ago. 2003. 11h41min.

_____. Analysis of refined oils for residual protein and lipid degradants. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002a, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11113.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____. Evaluation of antioxidant efficacy in treated and untreated oils and snacks using rapid membrane separation technology. In: IFT ANNUAL MEETING, 2000, Dallas. **Anais eletrônicos...** Dallas, 2000. Disponível em: <<http://ift.confex.com/ift/2000/techprogram/>>. Acesso em: 22 jul. 2003. 15h43min.

_____. Fat content and fat quality in nuts and nut butters. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002b, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11120.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____. Micro-analytical membrane technology to evaluate infant formula quality and monitor shelf life of infant formulas. In: IFT ANNUAL MEETING, 2001a, New Orleans. **Anais eletrônicos...** New Orleans, 2001. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/meeting_2001.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 15h42min.

_____. Quality and stability testing of infant formulas. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002c, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002. Disponível em:

<http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11113.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____. Rapid and routine quality testing using an innovative membrane separation technology. In: IFT ANNUAL MEETING, 2001b, New Orleans. **Anais eletrônicos...** New Orleans, 2001. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/meeting_2001.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 15h42min.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, p. 539-546, jun. 1978.

LEA, C. H. The oxidative deterioration of food lipids. In: SCHULTZ, H. W. **Symposium on foods: lipids and their oxidation**. Westport: AVI, 1962. p 3-29.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 4. ed. New York: John Wiley, 1997. 704 p.

_____.; PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis**. 2 ed. New York: John Wiley, 1992. 527 p.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993. 93 p.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; VINING, G. G. **Generalized linear models: with applications in engineering and the sciences**. New York: John Wiley, 2002. cap. 2, p. 7-62.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O. R.(Ed.). **Food chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p 225-320.

OSAWA, C. C. et al. Resultados preliminares de novos estudos do sistema Diamed F.A.T.S. na determinação do índice de peróxidos (PV) e ácidos graxos livres (AGL) de óleos refinados, óleos degomados e azeites de oliva. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL "TENDÊNCIAS E INOVAÇÕES EM TECNOLOGIA DE ÓLEOS E GORDURAS", 2003, Campinas. **Resumos...** Campinas: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 2003. 1 CD-ROM. Word for Windows.

PARSONS, R. **Statistical analysis: a decision-making approach**. New York: Harper & Row, 1974. cap 27.

PIÑOL, J. M. G.; BORONAT, M. C. de la T. Influencia de la tecnología en el valor nutritivo de los alimentos: lípidos. **Alimentaria**, v. 204, p. 15-21, 1989.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v. 30, n. 4, p. 277-290, 1995.

SAFTEST. **Certificate n° 030405**: FaSafe™ Standard test kit. Arizona: SafTest Inc, 2003a. Disponível em: <<http://www.aoac.org/testkits/certificates/030501certificate.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2004. 12h41min.

_____. **Certificate n° 030501**: PeroxySafe™ Standard test kit. Arizona: SafTest Inc, 2003b. Disponível em: <<http://www.aoac.org/testkits/certificates/030405certificate.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2004. 12h41min.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

YILDIZ, G.; WEHLING, R. L.; CUPPETT, S. L. Comparison of peroxide value determination in vegetable oil using four analytical methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 2, p. 103-107, 2003.

CAPÍTULO 2 – Correlação do teor de ácidos graxos livres de óleos vegetais avaliados por testes rápidos e pelo método oficial da AOCS¹

RESUMO

A medida de ácidos graxos livres (AGL) fornece uma informação importante sobre o estado oxidativo dos lipídios. O método oficial de determinação de AGL, baseado na titulometria, é considerado demorado e requer analista experiente. Os *kits FaSafe™* são alternativas simples e geram resultados rápidos. O presente estudo teve como objetivo correlacionar os resultados obtidos usando o método oficial da AOCS (Ca 5a-40) com os obtidos usando esses *kits*. Realizaram-se as análises de Regressão Linear e testes de ANOVA para validação do modelo e para comparação de médias, respectivamente. Avaliaram-se amostras de azeites de oliva (40), óleos vegetais brutos e degomados (10) e óleos refinados (16). A presença de pigmentos nos óleos brutos e degomados interferiu nos resultados obtidos com os *kits*. Para as demais amostras, estabeleceram-se as equações de correlação: $y = 0,86 x + 0,05$ (azeites de oliva) e $y = 0,96 x + 0,01$ (óleos refinados e azeites), com coeficientes de correlação de 0,99 para cada. Não houve diferença significativa estatisticamente entre os valores médios obtidos pelas duas metodologias tanto para os azeites como para os óleos refinados. Todas as amostras avaliadas apresentaram valores de %AGL de acordo com legislação vigente.

Palavras-chaves: ácidos graxos livres, correlação, método AOCS Ca 5a-40, óleos vegetais, DiaMed F.A.T.S.

¹Artigo de acordo com as normas de publicação da Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ABSTRACT

The quantity of free fatty acids (FFA) provides important information about the oxidative state of lipids. The official method for the determination of FFA, based on titration, is slow and requires a trained analyst. FaSafe™ kits provide simple alternatives which provide rapid results. The present study was designed to correlate the results obtained using the official AOCS method (Ca 5a-40) with those obtained using these kits. Linear Regression and ANOVA tests were used for validation of the model and the comparison of means, respectively. Samples of olive oils (n = 40), crude and degummed vegetable oils (n = 10), and refined oils (n = 16) were analyzed. The presence of color in crude and degummed oils interfered in the value of the results obtained with kits. For other samples, correlation equations were established: $y = 0.86x + 0.05$ (olive oils) and $y = 0.96x + 0.01$ (refined and olive oils), with a correlation coefficient of 0.99 for each. There was no statistically significant difference between the average values obtained by of the two methodologies for either olive oils or refined oils. All samples analyzed revealed %FFA values in agreement with the current legislation related to health and safety.

Keywords: free fatty acids, correlation, AOCS Ca 5a-40 method, vegetable oils, DiaMed F.A.T.S.

1 INTRODUÇÃO

Durante tanto o armazenamento, como no seu processamento, ou no uso como meio de transferência de calor, ou de transferência de massa, os lipídios podem sofrer transformações químicas das quais as mais importantes são: a rancidez hidrolítica, a rancidez oxidativa e a reversão (BOBBIO, P.; BOBBIO, F., 2001). A rancidez, seja hidrolítica ou oxidativa, é a deterioração dos lipídios e constitui-se num dos problemas técnicos mais importantes na indústria de alimentos.

A rancidez hidrolítica é a hidrólise da ligação éster por lipase ou umidade. A rancidez hidrolítica enzimática refere-se à hidrólise dos óleos e gorduras com a produção de ácidos graxos livres (AGL), devido à ação das enzimas lipases, presentes nas sementes oleaginosas ou lipases de origem microbiana. De forma não-enzimática, a rancidez hidrolítica se dá a altas temperaturas, produzindo ácidos graxos livres (HUI, 1996). É acelerada por luz e calor e os ácidos graxos livres formados são responsáveis pelo sabor e odor desagradáveis, especialmente em gorduras como a manteiga, que possui grande quantidade de ácidos graxos de baixo peso molecular. Porém, em gorduras com ácidos graxos não-voláteis, o sabor e o odor característico não se alteram com a deterioração. Nesse caso, é muito importante a medida quantitativa dos ácidos graxos livres para se determinar o grau de deterioração (CECCHI, 2003). Um outro efeito importante decorrente do aumento do teor de ácidos graxos livres é a diminuição do ponto de fumaça do lipídio, com reflexos sobre a inflamabilidade do mesmo (BOBBIO, P.; BOBBIO, F. 2001)

Em relação a óleos de fritura, a medida de ácidos graxos livres é um teste relativamente simples para avaliar a sua qualidade, apesar de não gerar informação completa sobre a adequação da gordura para uso posterior (BERGER, 1984). A acidez - número de miligramas de KOH requerido para neutralizar os ácidos graxos livres em 1 g de amostra (CECCHI, 2003) - aumenta com o aumento da deterioração do óleo durante o processo de fritura, pois uma maior quantidade de ácidos graxos livres é formada e não devendo ultrapassar o valor de 2,5 (PAUL; MITTAL, 1997).

A medida de ácidos graxos livres é, ainda, uma variável que está intimamente relacionada com a natureza e a qualidade da matéria-prima, com a qualidade e o grau de pureza da gordura, com o processamento e, principalmente, com as condições de

conservação da gordura (HUI, 1996). Segundo a Resolução nº 482 da ANVISA (BRASIL, 2000), o teor de AGL é uma das características de qualidade dos diversos óleos vegetais, tais como de arroz, soja, canola, milho, algodão, amendoim, girassol, uva, etc. e gorduras - babaçu, palma, palmiste e coco - e, entre outros parâmetros, classifica os azeites de oliva: virgem, extra-virgem, lampante, refinado, etc.

A determinação de ácidos graxos livres é dada pela porcentagem (em peso) de ácidos graxos livres, em relação a um ácido graxo específico, geralmente o ácido oléico (PM = 282 g) ou outro ácido graxo predominante na amostra. O procedimento está baseado na diluição da gordura em um solvente misto e neutralizado, seguida de titulação com uma solução padrão de NaOH, na presença de fenolftaleína como indicador (HUI, 1996; CECCHI, 2003; AOCS, 2004).

Os kits *FaSafe*TM HSY e STD do Sistema F. A. T. S. medem a concentração de ácidos graxos livres, através da modificação de cor do indicador xilenol laranja com a alteração do pH. Os resultados são expressos em % de ácido oléico (SAFETY ASSOCIATES, 1998; 1999; 2002; 2003; 2004).

Em congressos internacionais, foram apresentados trabalhos utilizando os kits *FaSafe*TM para avaliar o efeito de antioxidantes em três amostras de óleos (GORDON; MARTIN, 2000), para estudar óleos e *snacks* tratados ou não com antioxidantes (GORDON, 2000), no monitoramento de óleo de fritura (GORDON; ALIFF; LEE, 2000), para avaliar a qualidade de 50 óleos vegetais refinados (GORDON, 2002a), em amêndoas, em gordura de amêndoas e em barras nutricionais (GORDON, 2002b), em formulações infantis (GORDON, 2001; 2002c) e em óleos vegetais refinados e azeites de oliva (OSAWA et al., 2003).

A correlação entre laboratórios para valores de %AGL obtidos com o kit *FaSafe*TM foi de 0,97. Em relação à metodologia da AOCS, foi constatada correlação linear positiva, com valor de r igual 0,98, em um estudo com 276 diferentes amostras de óleos (GORDON; MARTIN, 2000).

Apesar da metodologia de determinação de %AGL dos kits DiaMed F.A.T.S. ser reconhecida pela AOAC (GORDON, 2004), através do certificado nº 030405 (SAFTEST, 2003), a literatura carece de estudos estatísticos que comprovem a eficácia do kit, assim como de estudos que o correlacionem com a metodologia oficial da AOCS.

O presente estudo teve como objetivo validar os *kits* de determinação da porcentagem de ácidos graxos livres DiaMed F.A.T.S. (*FaSafe*TM HSY e *FaSafe*TM STD, respectivamente de alta sensibilidade e padrão), aplicados a óleos vegetais refinados e azeites de oliva, correlacionando os resultados gerados pelos *kits* com os resultados obtidos pela metodologia oficial da AOCS Ca 5a-40.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

2.1.1 *kit FaSafe*TM HSY (de 0,02 a 0,2% ác. oléico)

Foram utilizadas 31 amostras, dentro dos prazos de validade, de óleos vegetais refinados (16), incluindo arroz, canola, girassol, milho, gergelim e soja e de azeites de oliva (15), adquiridas no comércio local e mantidas em local seco e fresco. As embalagens permaneceram lacradas até o momento da análise, iniciando-se pela metodologia oficial e no dia seguinte, prosseguindo com a quantificação com o *kit FaSafe*TM HSY, sendo que nesse período, as embalagens de lata foram fechadas com parafina.

2.1.2 *kit FaSafe*TM STD (acima de 0,2% ác. oléico)

Foram utilizadas outras 25 amostras de azeites de oliva, adquiridas no comércio local, e 10 amostras de óleos brutos e degomados, fornecidas por empresas de refino. Todas elas estavam dentro dos prazos de validade no momento das análises e foram mantidas em local seco e fresco. Similarmente ao procedimento para o *kit FaSafe*TM HSY, iniciaram-se as análises através do método oficial, prosseguindo-se com as análises com o *kit FaSafe*TM STD, e as embalagens de lata foram abertas apenas nos dias de análises, mantidas fechadas com parafina no período entre as análises.

2.2 METODOLOGIA OFICIAL

As análises foram realizadas em triplicata, seguindo-se a metodologia Ca 5a-40 (AOCS, 2004) utilizando material analítico apropriado e massas das amostras conforme indicado. A solução de NaOH foi padronizada com biftalato de potássio como padrão primário nos dias das análises, em duplicata, segundo Morita e Assumpção (2001). Para valores inferiores a 0,1% ác. oléico, foi utilizada solução titulante 0,05 N. Os resultados foram expressos como a média de três resultados, com 5% de tolerância para o coeficiente de variação (CV).

2.3 KITS DIAMED (FaSafe™ HSY e FaSafe™ STD)

Os procedimentos de análise com os *kits* foram realizados segundo orientação do fornecedor (Apêndices B-1 e B-2). Procedeu-se em triplicata e em caso do valor do coeficiente de variação ultrapassar 10%, as determinações foram repetidas, também em triplicata.

O teste consistiu na construção da curva de calibração, onde o valor de *r* admitido foi superior a 0,99, e em seguida realizou-se o teste com soluções de concentrações conhecidas, denominadas controles. Uma vez aprovada a curva de calibração através dos testes dos controles, iniciaram-se os testes com as amostras. Se rejeitada, nova curva de calibração foi construída e os controles foram testados novamente.

O procedimento das análises está esquematizado resumidamente na Figura 1.

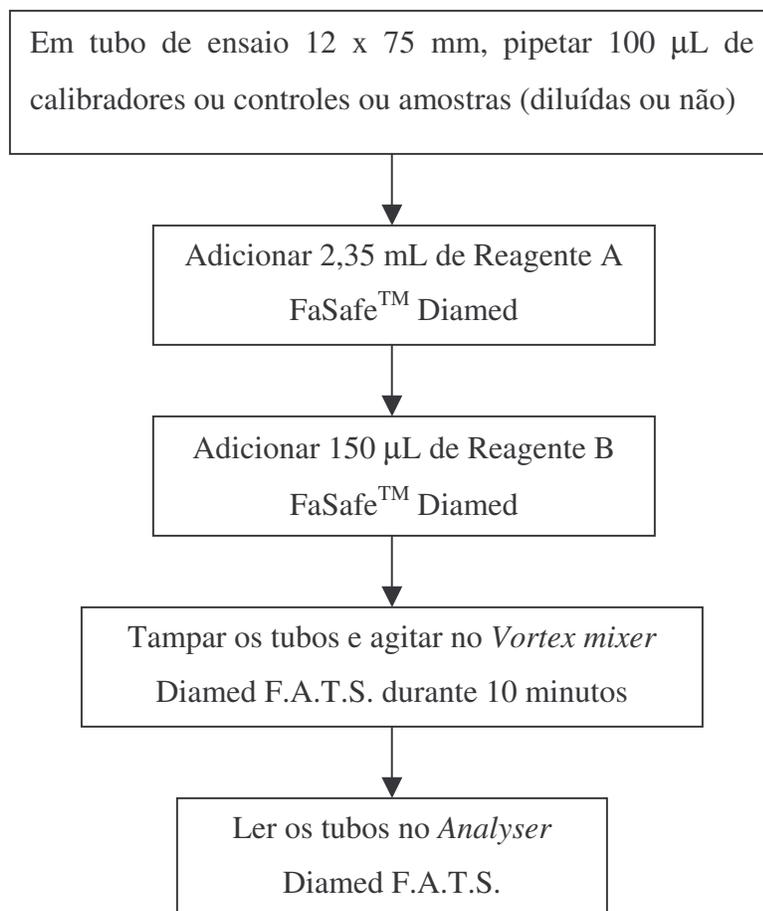


Figura 1. Fluxograma do procedimento das análises com os *kits* FaSafe™ para determinação do percentual de Ácidos Graxos Livres, de acordo com as informações do fabricante.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente, foram avaliados alguns parâmetros da estatística básica: média entre as repetições, desvio padrão, coeficiente de variação, diferença relativa entre dois valores, pontos de máximo e de mínimo.

Posteriormente, foi feita a análise de regressão linear para comparar os valores obtidos para ácidos graxos livres, expressos em % ácido oléico, através dos *kits* Diamed e os valores obtidos pelo método oficial.

Utilizou-se o programa *Minitab for Windows* versão 12.1 (MINITAB USER'S GUIDE, 1994; MINITAB REFERENCE GUIDE, 1994; RYAN JÚNIOR; JOINER; RYAN, 1976) para a obtenção da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (MONTGOMERY, 1991; COSTA NETO, 1992; MONTGOMERY; PECK, 1992), assim como as bandas de 95% de confiança e de 95% de predição (MONTGOMERY; PECK, 1992; CHARNET et al., 1999).

Prosseguiu-se com os testes da regressão, do coeficiente de correlação, da inclinação (igual a 1) e do intercepto (igual a 0) (MATNER et al., 1990; MONTGOMERY, 1991; COSTA NETO, 1992; MONTGOMERY; PECK, 1992).

Além da regressão linear, foi feita a Análise de Variância, utilizando o *software SAS for Windows V 8* (COUNCIL, 1985).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 *kit* FaSafe™ STD – Azeites de oliva

Das 25 amostras de azeites analisadas (Apêndice F-1), 15 possuíam no rótulo o valor máximo de AGL, em %. Apenas uma das amostras (nº11) apresentou valor de AGL superior ao declarado, para ambas as metodologias empregadas.

Os valores de %AGL das amostras foram de 0,21 a 2,01% ácido oléico e 0,17 a 2,17% ácido oléico, respectivamente, para as determinações através do *kit* e pela metodologia oficial (Figuras 2 e 3), observando-se que os valores de CV das amostras foram superiores para o *kit*, variando de 0,7 a 8,9%, enquanto que para o método da AOCS, foram de 0,1 a 4,0%.

As diferenças entre as metodologias foram de -25,5 a 33,8% e podem ser melhor visualizadas, através das Figuras 4 e 5.

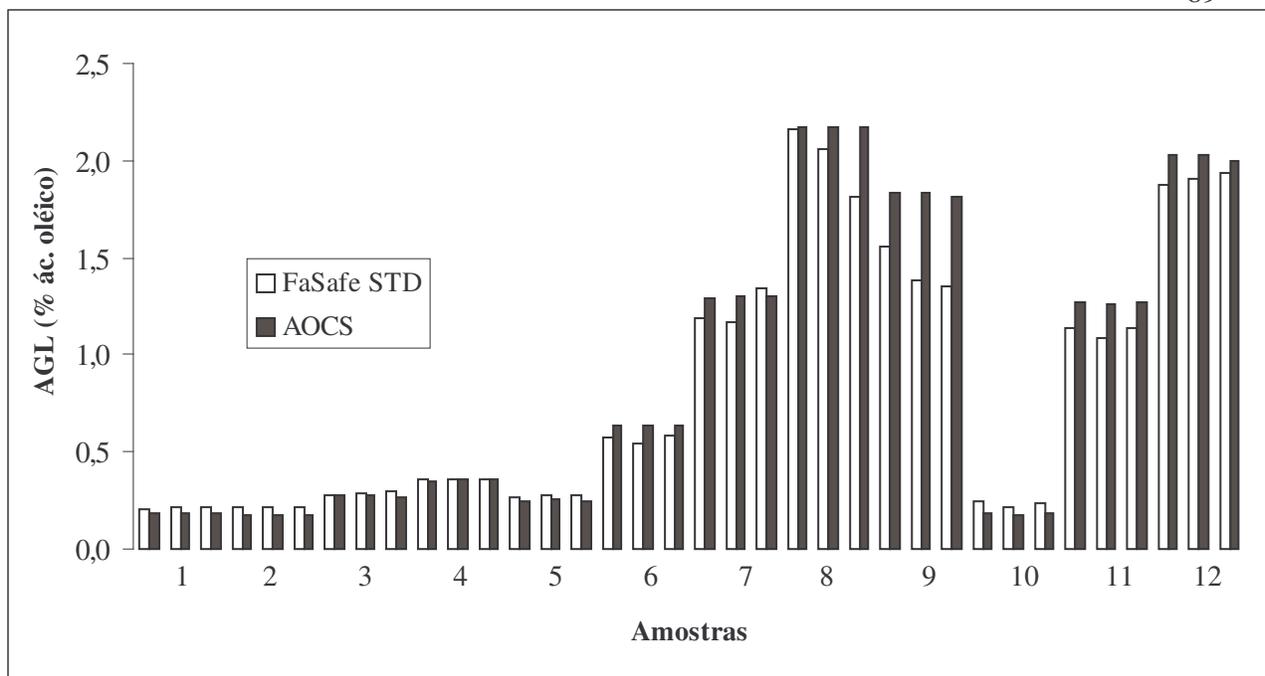


Figura 2. Gráfico ilustrativo dos valores de AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo kit FaSafe™ STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 1 a 12 de azeites comerciais.

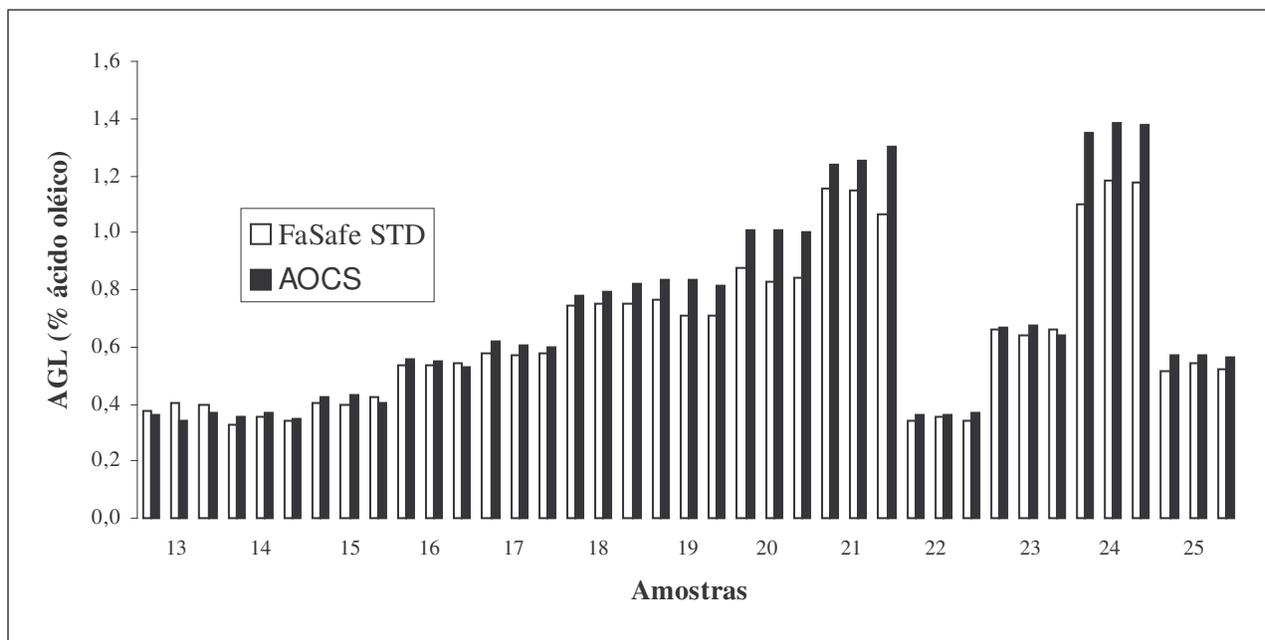


Figura 3. Gráfico ilustrativo dos valores de AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo kit FaSafe™ STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 13 a 25 de azeites comerciais.

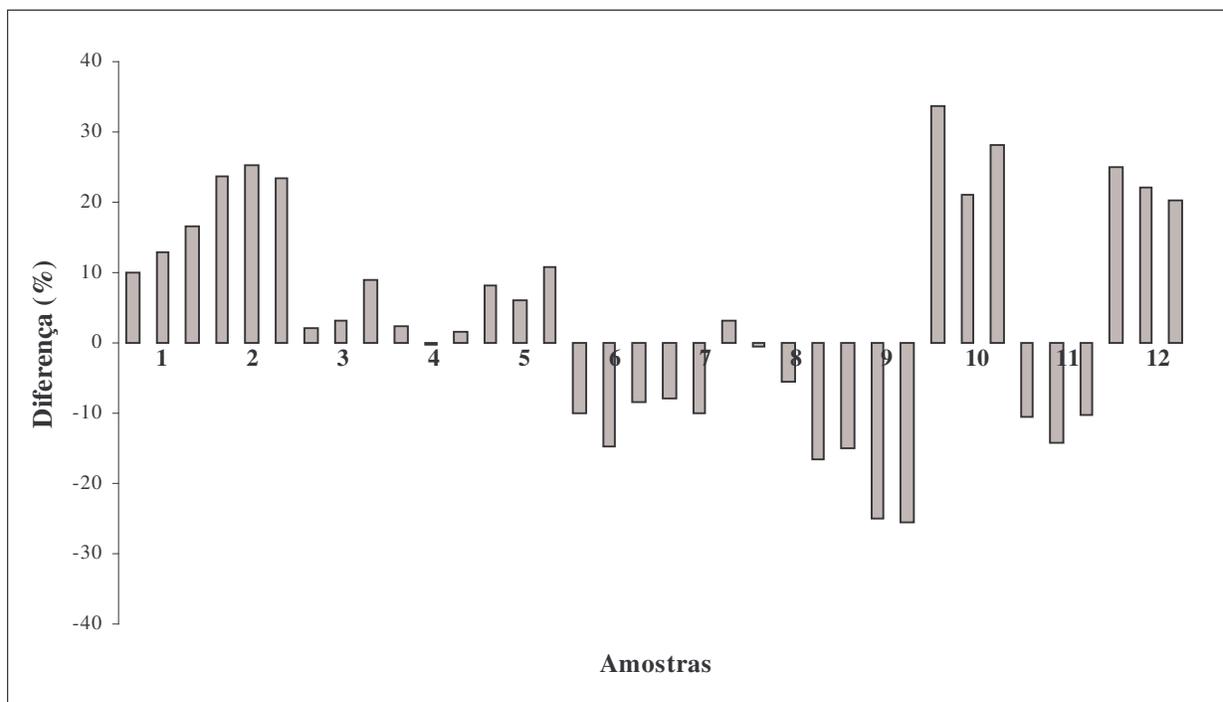


Figura 4. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo *kit FaSafe™ STD* e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 1 a 12 de azeites comerciais.

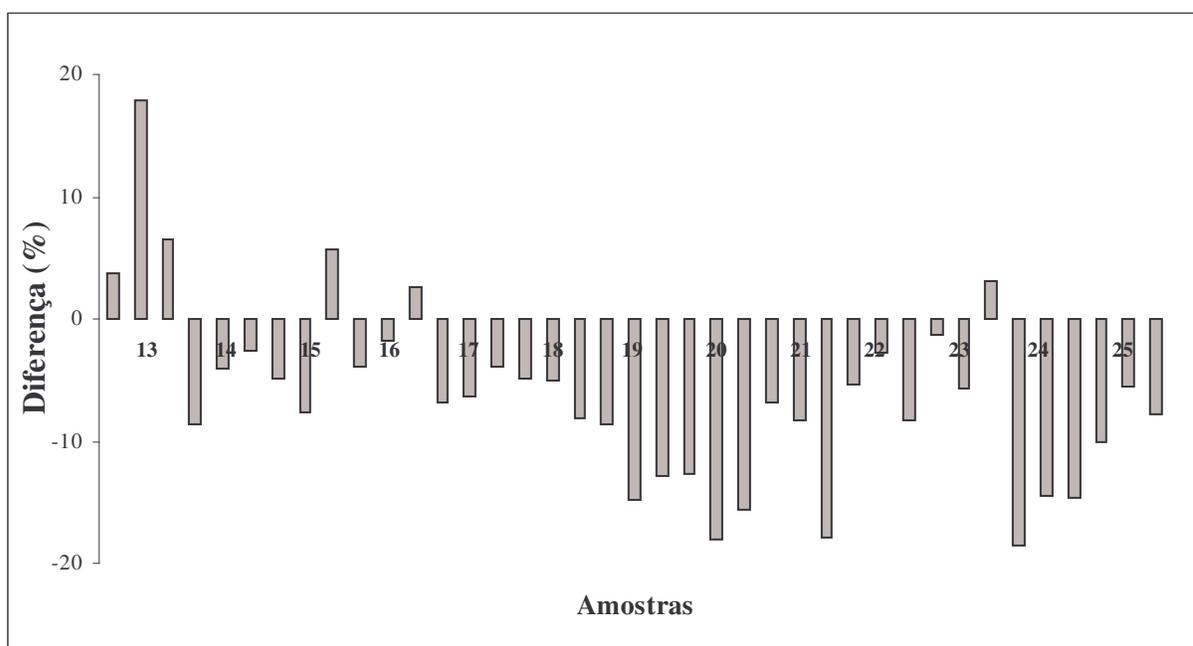


Figura 5. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo *kit FaSafe™ STD* e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 13 a 25 de azeites comerciais.

3.1.1 Análise do modelo

A Figura 6 ilustra a correlação existente entre ambas as metodologias, cuja equação é $y = 0,86x + 0,05$, com o coeficiente de determinação $R^2 = 0,98$. O valor de r obtido (0,99) sugere que existe correlação linear positiva entre as metodologias, explicando 98% da variação dos resultados obtidos pelo *kit* FaSafe™ STD.

Do teste da inclinação e do intercepto, obteve-se que a inclinação foi diferente de 1 e o intercepto, diferente de 0, ao nível de 1 e 5% de significância.

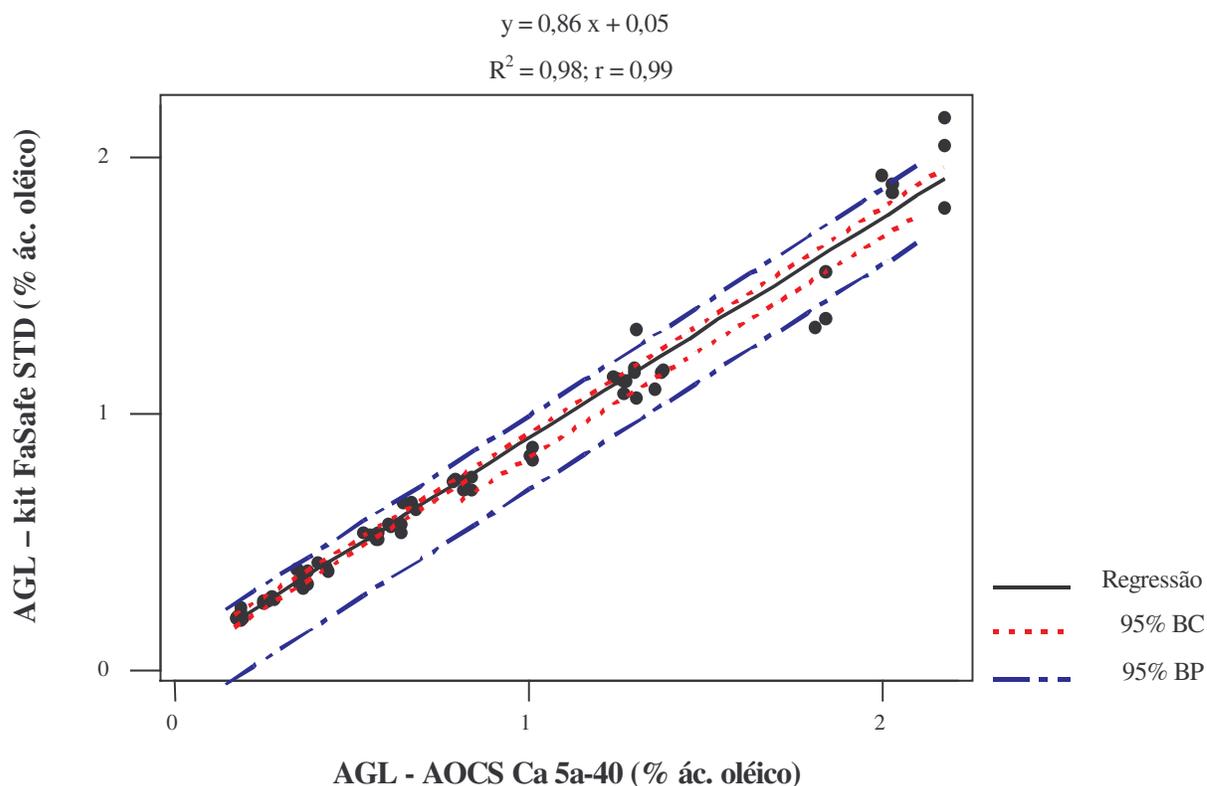


Figura 6. Gráfico da correlação entre os valores de AGL de 25 amostras de azeites comerciais, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* FaSafe™ STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

De acordo com a Análise de Variância (Tabela 1), o modelo de regressão linear foi validado, pois o valor de F obtido foi altamente significativo ($F_{\text{calc}} > F_{\text{Tab}}$).

Tabela 1. Teste de ANOVA para a regressão linear - *kit* FaSafe™ STD, azeites de oliva.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab}	p
Regressão	18,49	1	18,49	3562,96	3,98 ($\alpha = 5\%$)	0,000
Erro Residual	0,38	73	0,005			
Total	18,87	74				

3.1.2 Comparação de médias

Apesar da hipótese de inclinação igual a 1 ter sido rejeitada, não houve diferença significativa entre as médias obtidas pelas metodologias no teste de ANOVA, ao nível de 1% ou 5% de significância (Tabela 2).

Tabela 2. Teste de ANOVA para comparação de médias - *kit* FaSafe™ STD, azeites de oliva.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	0,0229	1	0,0229	1,64	6,85 ($\alpha = 1\%$)	0,2030
Amostras	80,2318	25	3,20927		3,92 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	1,8024	129	0,01397			
Total	82,0571	155				

3.2 *kit* FaSafe™ STD – Óleos brutos e degomados

O teor de ácidos graxos livres presentes nos óleos brutos e degomados foi de 0,34 a 1,42% ácido oléico e de 0,17 a 3,30% ácido oléico, respectivamente, para as determinações com o *kit* e pelo método da AOCS. Em relação à repetitividade da análise, avaliada pelo valor de CV, o *kit* revelou resultados com valores de CV de 0,9 a 9,7%, enquanto que os valores de CV para o método oficial variaram de 0,3 a 3,2%, com exceção de 3 amostras, cujos valores foram superiores a 10%, chegando a 105,8% (Apêndice F-2). Tal fato pode

ser explicado pela presença de pigmentos em óleos brutos e degomados, influenciando a observação do ponto final da titulação com indicador.

Considerando que a Resolução nº 482 (BRASIL, 2000) estabelece os teores máximos de AGL de 1,0% ácido oléico para os óleos degomados de canola e soja, 2,0% ácido oléico para os óleos brutos de soja e canola e 6,0% ácido oléico para os óleos brutos de milho. Avaliando individualmente os resultados de cada amostra analisada, nenhum dos óleos com limites estabelecidos ultrapassaram seu respectivo valor na avaliação por ambos os métodos, embora os valores de CV encontrados tenham chegado a 105,8%.

As diferenças entre os valores de AGL obtidos por ambas as metodologias foram, em geral, elevadas, chegando à ordem de 500%, como se pode constatar na Figura 7.

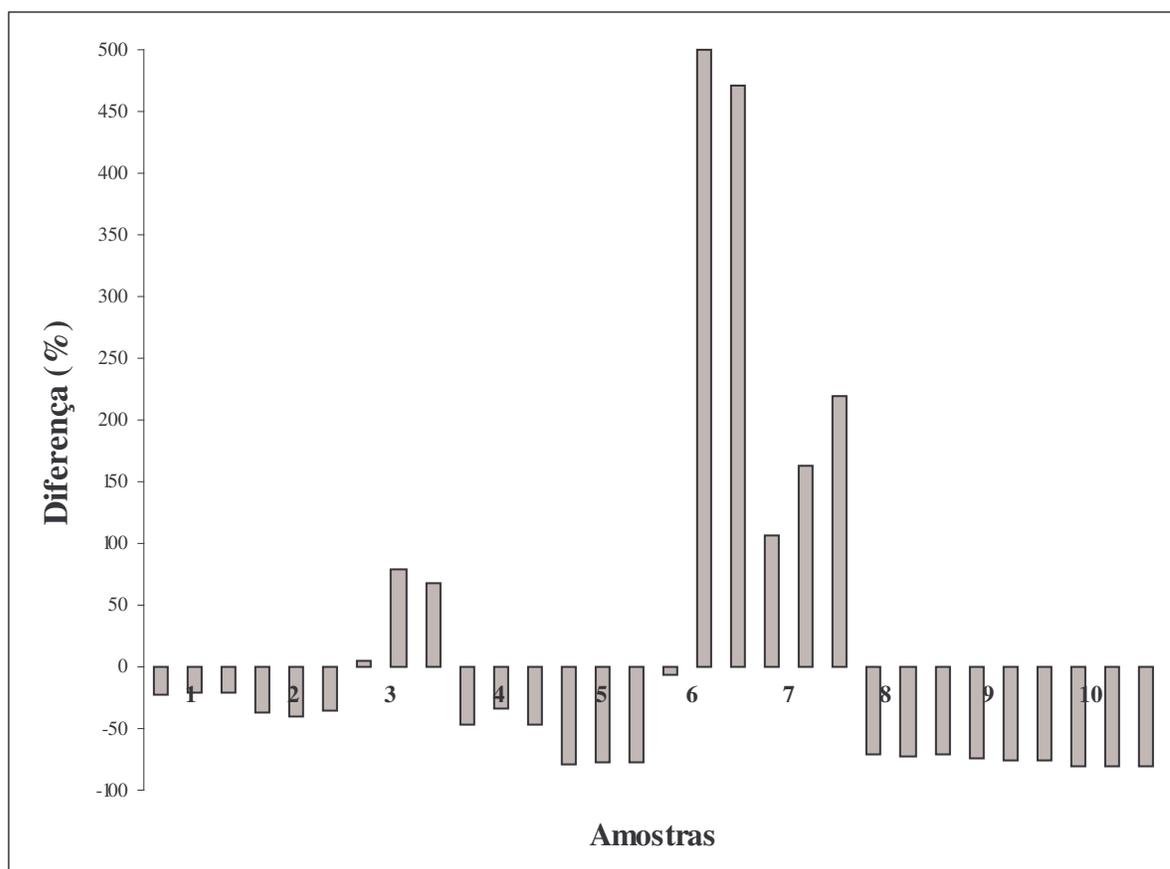


Figura 7. Diferença entre os valores de AGL, em %, obtidos pelo *kit* FaSafe STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40 para óleos brutos e degomados.

3.2.1 Análise do modelo

De acordo com a Figura 8, não foi possível estabelecer uma correlação entre as metodologias empregadas na determinação de ácidos graxos livres para óleos brutos e degomados. Nota-se claramente que a maioria dos pontos estão fora da região delimitada pelas Bandas de Confiança, um sinal de fraco ajuste do modelo. Somado a isso, a dispersão dos valores, se comparada com a da Figura 6, foi significativamente maior.

A razão para o fraco ajuste do modelo foi o alto teor de pigmentos presentes nesses óleos, interferindo não apenas no método oficial, como também no método do *kit*, baseado na mudança de cor do indicador com a variação do pH.

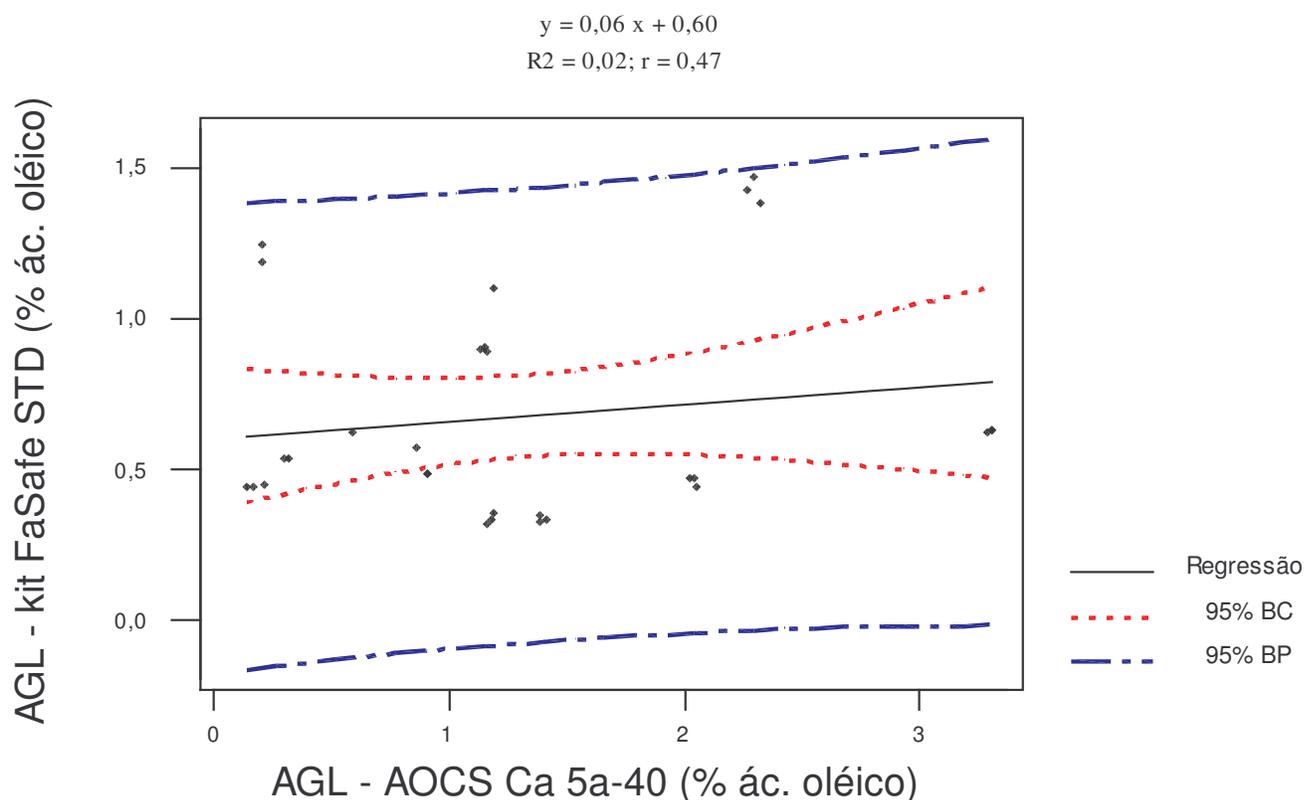


Figura 8. Gráfico da correlação entre os valores de AGL de 10 amostras de óleos brutos e degomados, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* FaSafe™ STD e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

3.3 *kit FaSafe™ HSY*

Os valores de ácidos graxos livres de azeites e óleos vegetais segundo o *kit FaSafe™ HSY* e o método AOCS Ca 5a-40 foram de 0,02 a 1,29% ácido oléico (CV = 0,5 - 10%) e 0,02 a 1,39% ácido oléico (CV = 0,0 - 4,2%). Os resultados podem ser visualizados no Apêndice F-3.

Todos os azeites, cujos valores máximos de AGL estavam declarados no rótulo, apresentaram valores de AGL correspondentes pelas duas metodologias. Fato similar aconteceu com os óleos refinados de arroz, algodão, canola, girassol, milho e soja. Todos obedeceram ao limite máximo de 0,3% ác. em oléico, estabelecido pela Resolução nº 482 (BRASIL, 2000), através das determinações pelo método oficial e pelo *kit*.

As Figuras 9 e 10 apresentam os valores de AGL dos azeites de oliva e dos óleos vegetais, obtidos por ambos os métodos.

As diferenças entre os valores de AGL obtidos por ambas as metodologias foram de -45,6 a 61,0% (Figuras 11 e 12).

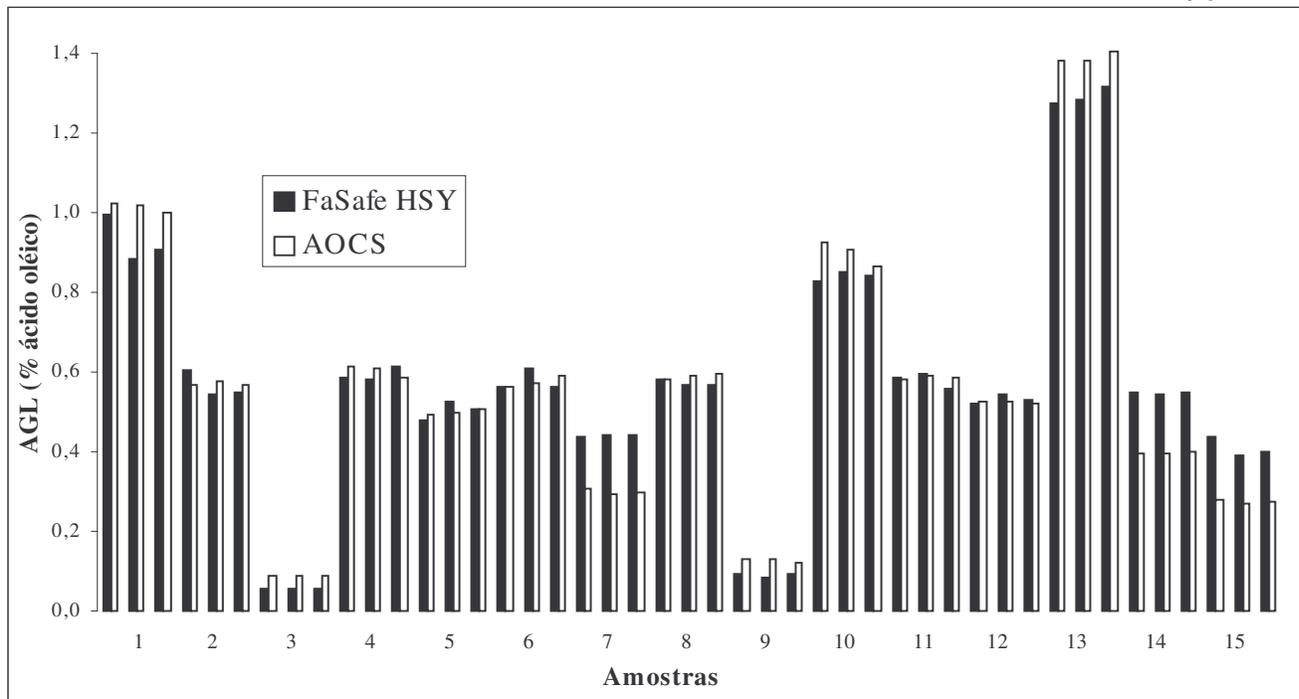


Figura 9. Gráfico ilustrativo dos valores de AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* FaSafe™ HSY e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 1 a 15 de azeites de oliva.

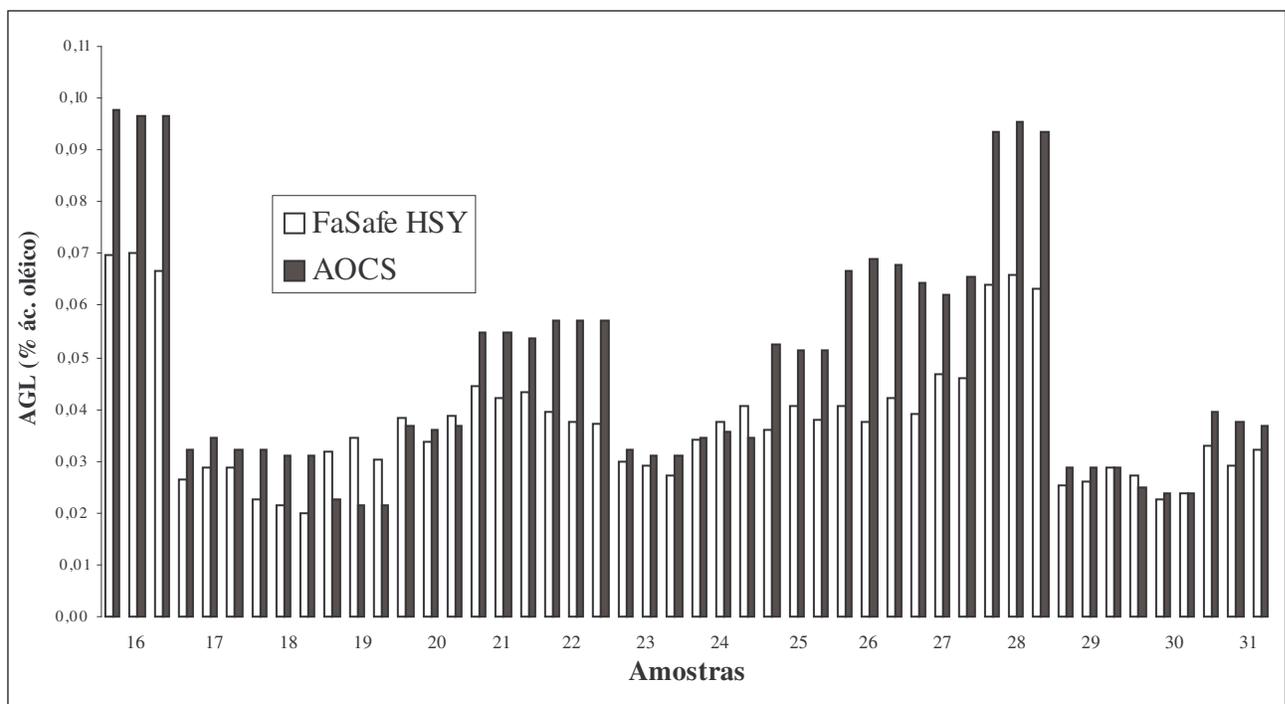


Figura 10. Gráfico ilustrativo dos valores de AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* FaSafe™ HSY e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 16 a 31 de óleos vegetais refinados.

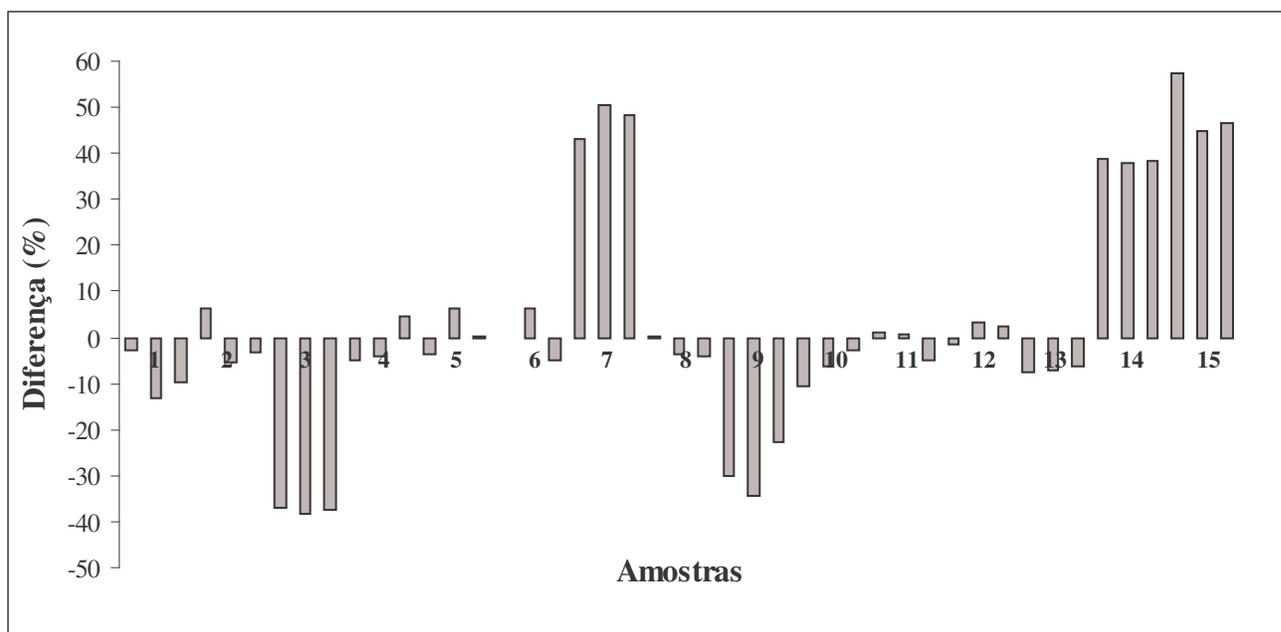


Figura 11. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo *kit FaSafe™ HSY* e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 1 a 15 de azeites de oliva.

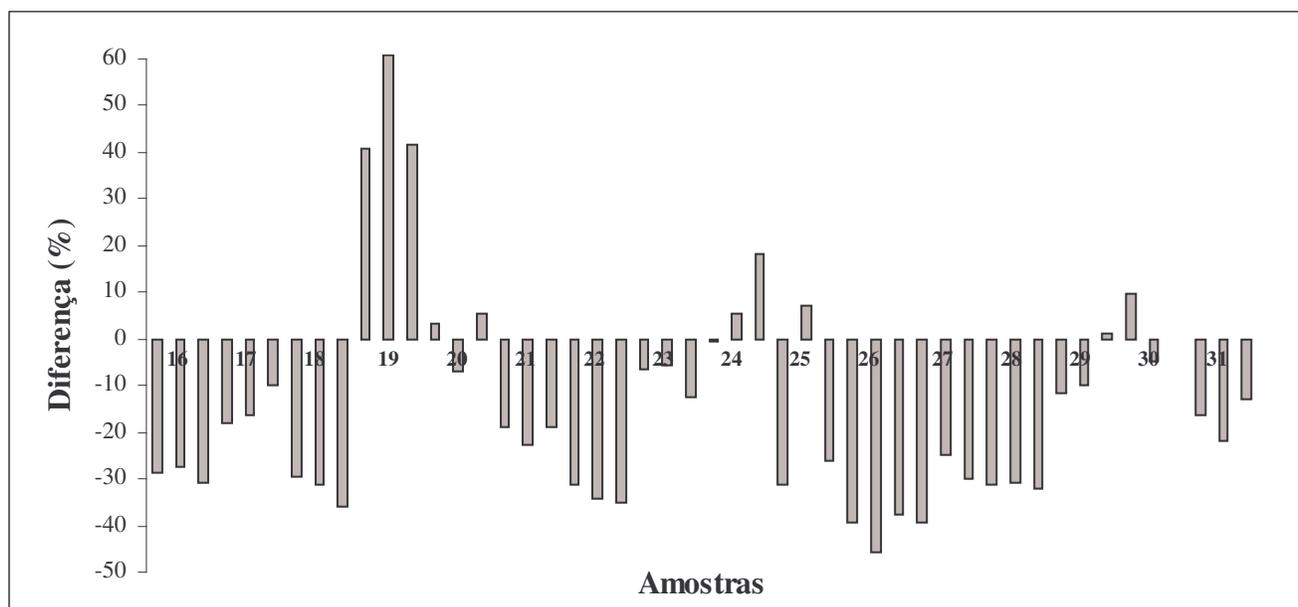


Figura 12. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo *kit FaSafe™ HSY* e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, em triplicata, para as amostras 16 a 31 de óleos vegetais refinados.

3.3.1 Análise do modelo

A Figura 13 apresenta o gráfico da regressão linear, bem como as bandas de 95% de confiança e de 95% de predição. Nota-se a elevada correlação linear positiva entre os métodos, explicando 97% da variação de %AGL obtida pelo *kit*. Os pontos estão tão ajustados à reta, que as Bandas de Confiança e de Predição não parecem ser hiperbólicas.

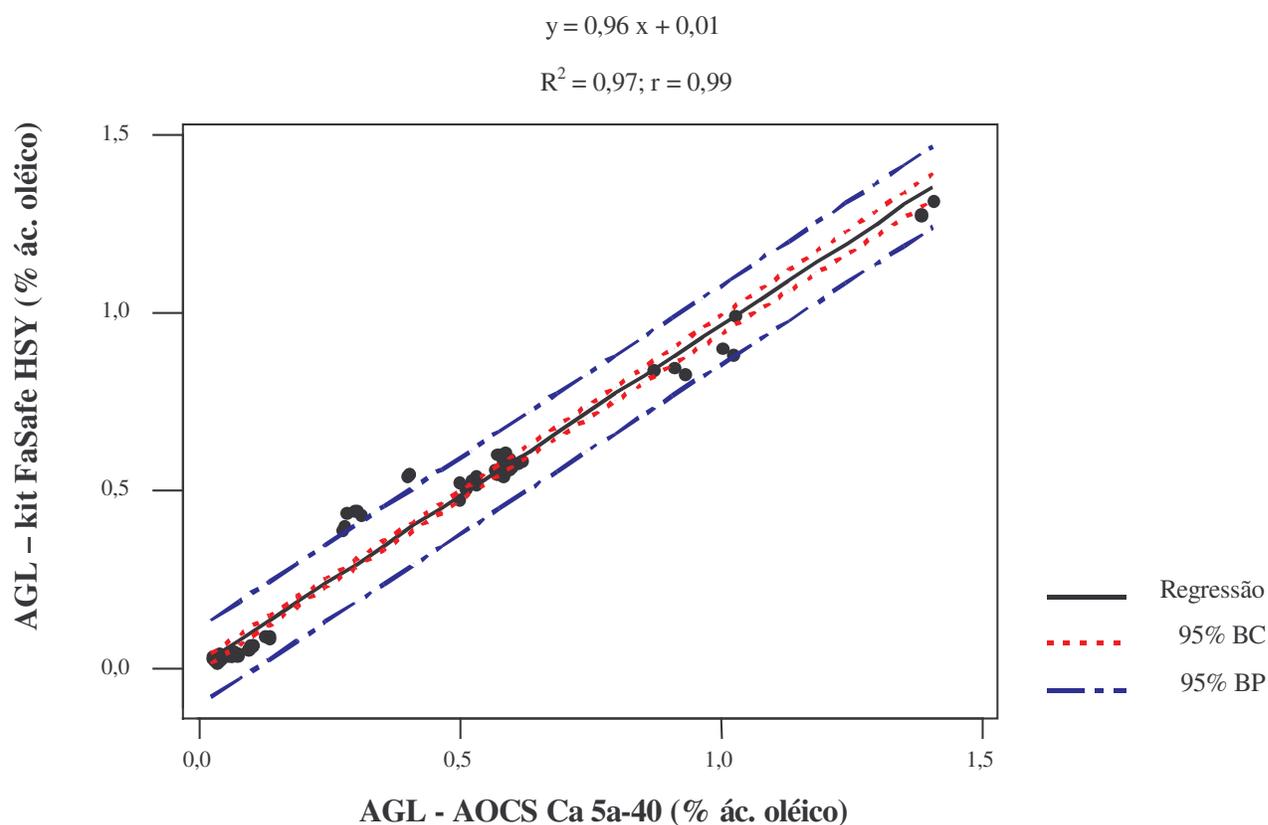


Figura 13. Gráfico da correlação entre os valores de AGL de azeites e óleos vegetais refinados, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* FaSafe™ HSY e pela metodologia AOCS Ca 5a-40, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

A regressão linear é representada pela equação $y = 0,96x + 0,01$, cujos parâmetros intercepto e inclinação equivaleram a 0 e 1, respectivamente, ao nível de 1 e 5% de significância.

A Tabela 3 do teste de ANOVA para a regressão sugere que o modelo foi eficaz ($F_{\text{calc}} > F_{\text{Tab}}$).

Tabela 3. Teste de ANOVA para a regressão linear - *kit* FaSafe™ HSY, azeites de oliva e óleos vegetais refinados.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F_{Calc}	F_{Tab}	p
Regressão	10,69	1	10,69	3434,16	3,95 ($\alpha = 5\%$)	0,000
Erro Residual	0,283	91	0,003			
Total	10,97	92				

3.3.2 Comparação de médias

Segundo a ANOVA (Tabela 4), não houve diferença significativa entre os valores de AGL obtidos pelo *kit* FaSafe™ STD e os valores obtidos pelo método oficial, ao nível de 1 e 5% de significância.

Tabela 4. Teste de ANOVA para comparação de médias. *kit* FaSafe™ HSY, azeites de oliva e óleos vegetais refinados.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F_{Calc}	F_{Tab} metod.	Pr > F
Metodologias	0,00018	1	0,00018	0,18	6,85 ($\alpha = 1\%$)	0,6682
Amostras	21,1825	30	0,70608		3,92 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	0,15368	154	0,001			
Total	21,3364	185				

4 CONCLUSÕES

Os resultados de ácidos graxos livres, obtidos pelos *kits* FaSafe™ STD e FaSafe™ HSY apresentaram alta correlação com a metodologia oficial da AOCS Ca 5a-40, quando empregados em azeites de oliva e óleos vegetais refinados. Comparando os resultados obtidos por ambas as metodologias, não houve diferença estatística, constituindo os *kits* em uma alternativa válida quando se necessita analisar grandes quantidades de amostras em pequeno intervalo de tempo, com geração de menores quantidades de resíduos. Em vista disso, recomenda-se a utilização dos *kits* para análises rotineiras em laboratórios comerciais, onde o emprego dos métodos oficiais é desfavorável.

O método não foi eficaz para óleos brutos e degomados, devido à interferência de teores elevados de pigmentos presentes nesses tipos de óleos, se comparados com os teores contidos nos azeites de oliva. Para se ter uma idéia, a literatura relata teores de clorofila de 5 a 35 mg/kg para óleo bruto de canola (TEASDALE; MAQ, 1983) e teores de carotenóides de 25 a 50 mg/kg para o óleo bruto de canola e de 40 a 50 mg/kg para soja (SWERN, 1979), enquanto que para o azeite de oliva os teores de clorofila e carotenóides foram de 5,5 e 7,1 mg/kg, respectivamente (MORELLÓ et al., 2003). Estudos devem ser realizados, de forma a eliminar a ação de interferentes nos métodos de análise através dos *kits*.

5 REFERÊNCIAS

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 2004.

BERGER, K. G. The practice of frying. **PORIM Technology**, n. 9, 1984. 30 p.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 3. ed. rev. ampl. São Paulo: Varela, 2001. 143 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 482, 23 set. 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 jun. 2000. Seção 1. p. 21-25. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm>. Acesso em: 18 set. 2003. 11h27min.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 2. ed. rev. Campinas: Editora da Unicamp, 2003. 207 p.

CHARNET, R. et al. **Análise de modelos de regressão linear**. Campinas: Editora da Unicamp, 1999. 356 p.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. 12. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1992. 264 p.

COUNCIL, K. A. Analysis of variance. In: HELWIG, J. T. (Ed.). **SAS Introductory guide**. 3 ed. Cary: SAS Institute Inc., 1985. p. 55-60.

GORDON, V. C. Analysis of refined oils for residual protein and lipid degradants. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002a, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11113.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____. Evaluation of antioxidant efficacy in treated and untreated oils and snacks using rapid membrane separation technology. In: IFT ANNUAL MEETING, 2000, Dallas. **Anais eletrônicos...** Dallas, 2000. Disponível em: <<http://ift.confex.com/ift/2000/techprogram/>>. Acesso em: 22 jul. 2003. 15h43min.

_____. Fat content and fat quality in nuts and nut butters. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002b, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11120.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____. Micro-analytical membrane technology to evaluate infant formula quality and monitor shelf life of infant formulas. In: IFT ANNUAL MEETING, 2001, New Orleans. **Anais eletrônicos...** New Orleans, 2001. Disponível em:

<http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/meeting_2001.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 15h42min.

_____. **Publicação eletrônica** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <cibelec@fea.unicamp.br> em 20 jan. 2004.

_____. Quality and stability testing of infant formulas. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002c, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11113.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____.; ALIFF, S.; LEE, H. Monitoring frying oils and fried food products using a membrane separation system. In: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS) ANNUAL MEETING – FRYING OIL QUALITY II SESSION, 2000. **Resumos...** American Oil Chemists' Society, 2000.

_____.; MARTIN, D. New method using membrane separation to test refined oils for lipid peroxides (0,01 to 2,0 meq/kg), free fatty acids (0,03 to 0,3%), and antioxidant concentrations (ppm). In: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS) ANNUAL MEETING – GENERAL ANALYTICAL II SESSION, 2000. **Resumos...** American Oil Chemists' Society, 2000.

HUI, Y. H. (Ed.). **Bailey's industrial oil & fat products**. New York: John Wiley, 1996. 567 p. v. 3.

MATNER, R. R. et al. Efficacy of the Petrifilm E. coli count plates for E. coli and coliform enumeration. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 2, p. 145-150, 1990.

MINITAB USER'S GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. 285 p.

MINITAB REFERENCE GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. v. 1.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3 ed. Singapore: John Wiley, 1991. 649 p.

_____.; PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis**. 2 ed. New York: John Wiley, 1992, 527 p.

MORITA, R.; ASSUMPCÃO, R. M. **Manual de soluções, reagentes e solventes:** padronização, preparação, purificação. 11 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 629 p.

MORELLÓ, J.-R. et al. Effect of freeze injuries in olive fruit on virgin olive oil composition. **Food Chemistry**, v. 81, p. 547-553, 2003.

OSAWA, C. C. et al. Resultados preliminares de novos estudos do sistema Diamed F.A.T.S. na determinação do índice de peróxidos (PV) e ácidos graxos livres (AGL) de óleos refinados, óleos degomados e azeites de oliva. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL “TENDÊNCIAS E INOVAÇÕES EM TECNOLOGIA DE ÓLEOS E GORDURAS”, 2003, Campinas. **Resumos...** Campinas: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 2003. 1 CD-ROM. Word for Windows.

PAUL, S.; MITTAL, G. S. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 7, p. 635-662, 1997.

RYAN JÚNIOR, T. A.; JOINER, B. L.; RYAN, B. F. **Minitab student handbook**. Massachusetts: Duxbury, 1976. 337 p.

SAFETY ASSOCIATES. Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John Sorensen, John F. Elias, Virginia C. Gordon. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. CA n. PI 2267226, 30 set. 1997, 09 abr. 1998.

_____. John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi, Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 4197235, 27 fev. 2004, 07 out. 2004.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. AU n. PI 759265, 21 out. 1998, 29 abr. 1999.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 3064423, 26 mar. 2003, 03 abr. 2003.

_____. Virginia C. Gordon, John Sorensen, Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. US n. PI 6489132, 02 set. 1999, 03 dez. 2002.

SAFTEST. **Certificate n° 030405**: FaSafe™ Standard test kit. Arizona: SafTest Inc, 2003. Disponível em: <<http://www.aoac.org/testkits/certificates/030501certificate.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2004. 12h41min.

SWERN, D. (Ed.). **Bailey's industrial oil and fat products**. New York: Wiley, 1979. v. 1. p. 177-233.

TEASDALE, B. F.; MAQ, J. K. The commercial processing of high and low erucic acid rapeseed oils. In: KRAMER, J. K. G.; SAUER, F. D.; PIGDEN, W. J. (Ed.). **High and Low Erucic Acid Rapeseed Oils**. Toronto: Academic, 1983. p. 216-218.

6 AGRADECIMENTOS

À DiaMed AG (Suíça) pelo financiamento da pesquisa e fornecimento dos kits.

CAPÍTULO 3 – Determinação de peróxidos em óleos vegetais utilizando *kits* e a correlação desses resultados com os obtidos com o método AOCS Cd 8b-90²

RESUMO

Os produtos iniciais da oxidação de lipídios são denominados peróxidos e são geralmente quantificados por iodometria, embora a ação de interferentes e a dificuldade na detecção do ponto final da titulação possa gerar resultados imprecisos. Os *kits* PeroxySafe™ HSY e PeroxySafe™ STD são alternativas rápidas e precisas, requerendo quantidades mínimas de amostras e com pequena geração de resíduos. Vinte e uma amostras de óleos refinados, banha e gorduras hidrogenadas e 20 amostras de óleos de soja vencidos foram avaliadas com os *kits* HSY e STD, respectivamente, e com o método iodométrico oficial. Compararam-se os valores utilizando o Método dos Mínimos Quadrados e validou-se o modelo com ANOVA. As equações de correlação foram as seguintes: $y = 1,03 x + 1,11$ ($r = 0,94$) e $y = 1,22 x + 0,32$ ($r = 0,93$) para os *kits* STD e HSY, respectivamente. Não houve diferença significativa aos níveis de 0,01 e 0,05 para os valores obtidos pelo último *kit*, enquanto que a alta correlação entre os resultados do *kit* STD e o método oficial permitiu estabelecer a equivalência de valores com a multiplicação dos resultados do *kit* por 0,80. Encontraram-se maiores diferenças para valores de peróxidos inferiores a 2 meq/kg, devido ao volume relativamente pequeno de titulante usado no método oficial (< 1,5 mL). Dessa forma, recomendam-se outros estudos, utilizando solução titulante mais diluída, a fim de minimizar a diferença entre métodos pelo maior volume requerido.

Palavras-chaves: índice de peróxido, DiaMed F.A.T.S., método AOCS Cd 8b-90, correlação, óleos e gorduras.

²Artigo de acordo com as normas de publicação da Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ABSTRACT

The primary products of lipid oxidation are peroxides, and these are usually quantified using iodometric methods, although the action of interferents and difficulty in determination of titration end point can lead to imprecise results. PeroxySafe kits provide a fast and simple alternative requiring minimal sample sizes and generating few residues. Twenty-one samples of refined oils, lard and hydrogenated fats and 20 expired samples of soybean oil were evaluated by HSY and STD kits, respectively, as well as by the official iodometric method. The values were compared using the Least Squares Method, and the model was validated with an ANOVA. Correlation equations were established as follows: $y = 1.03x + 1.11$ ($r = 0.94$) and $y = 1.22x + 0.32$ ($r = 0.93$) for the STD and HSY kits, respectively. There was no significant difference at either the 0.01 or 0.05 level for the values obtained by the latter kit, while the high correlation between results from the STD kit and the official method made it possible to establish equivalence by multiplying kit results by 0.80. Larger differences were found for peroxide values of less than 2 meq/kg, due to the relatively small volume of titrant used in the official method (< 1.5 mL). Further studies using a more dilute titrant solution are thus recommended, since this might minimize the difference between methods for these larger volume required.

Keywords: peroxide value, DiaMed F.A.T.S., AOCS Cd 8b-90 method, correlation, oil and fats.

1 INTRODUÇÃO

Peróxidos são os principais produtos iniciais da autoxidação de lipídios e podem ser medidos através de técnicas fundamentadas na habilidade de liberar iodo a partir de iodeto de potássio (iodometria), na oxidação de ferro a íons férrico, cujas reações estão expressas nas equações 1 e 2, respectivamente, ou, ainda, através de reações enzimáticas, métodos físicos ou técnicas cromatográficas (DOBARGANES; VELASCO, 2002).



O índice de peróxido (IP) é geralmente expresso em termos de miliequivalentes de oxigênio por quilograma de lipídio e, embora o método seja aplicado na formação de peróxido nos estágios iniciais da oxidação, é altamente empírico. Sua eficácia é questionável e os resultados variam conforme os procedimentos específicos utilizados, com a temperatura, disponibilidade de oxigênio, quantidade de óleo ou proporção de ar em relação ao óleo (NAWAR, 1996; CRAPISTE; BREVEDAN; CARELLI, 1999). Durante o decurso da oxidação, o índice de peróxido atinge um pico e então declina (NAWAR, 1996).

Ainda não foi provado que o índice de peróxido é um teste útil para óleos de frituras. Pode conduzir a um falso resultado e não reproduz as condições da fritadeira, uma vez que os peróxidos continuam a ser formados enquanto o óleo é resfriado e antes da amostra ser testada (BERGER, 1984). Por outro lado, nas temperaturas de fritura, os peróxidos podem se desenvolver, mas são também evaporados e deixam o sistema de fritura nessas temperaturas elevadas. Sendo assim, o índice de peróxido é de pequena ou nenhuma significância no julgamento das condições do óleo utilizado na fritura (LAWSON, 1985).

1.1 ENSAIOS IODOMÉTRICOS

A metodologia oficial AOCS de determinação do índice de peróxido é um ensaio iodométrico (AOCS, 2004).

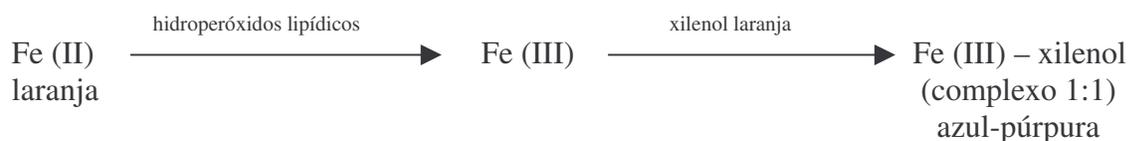
As desvantagens dos ensaios iodométricos são a susceptibilidade à interferência do oxigênio molecular e à reação de liberação de iodo com outros componentes do sistema. Além disso, há indícios do efeito “*threshold*”, abaixo do qual os níveis de hidroperóxidos não podem ser medidos (NOUROOZ-ZADEH et al., 1995), refletindo-se em baixa sensibilidade e necessidade de grandes quantidades de lipídios e dificuldades na determinação do ponto final da titulação (DOBARGANES; VELASCO, 2002). A sensibilidade à luz e ao oxigênio são outros inconvenientes (GAY; GEBICKI, 2002).

Por um lado, a absorção do iodo pela insaturação dos ácidos graxos pode conduzir a um menor valor. Por outro, a liberação do iodo do iodeto de potássio pelo oxigênio presente na solução a ser titulada pode gerar um valor elevado de peróxido. Somado a isso, existem outras fontes de erro, entre elas a variação na massa da amostra e condições de reação, tais como tempo e temperatura; o grau e tipo de acidez; a constituição e a reatividade do peróxido titulado (MEHLENBACHER, 1960).

Outra fonte de erro da metodologia da AOCS é o fato do ácido acético não proporcionar íons H^+ suficientes para a reação se completar, enquanto que a acetona, o álcool etílico e o isopropanol reagem com o iodo na presença de água e ácido (HARTMAN; WHITE, 1952 apud MEHLENBACHER, 1960).

1.2 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS COM Fe(III)

A literatura tem introduzido métodos de determinação de hidroperóxidos baseados na oxidação de Fe^{2+} na presença de xilenol laranja em solução ácida, formando o complexo colorido Fe-xilenol laranja na faixa do visível, segundo a reação a seguir (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991; BURAT; BOZKURT, 1996; GAY; COLLINS; GEBICKI, 1999; GAY; GEBICKI, 2000; GRAU et al., 2000; GAY; GEBICKI, 2002; YIN; PORTER, 2003).



O complexo azul-púrpura é formado na faixa de absorvância entre 550 e 600 nm. O método requer 10 a 300 µg de amostra, apresenta alta repetitividade, porém baixa reprodutibilidade (DOBARGANES; VELASCO, 2002). A cor formada é estável por várias horas na maioria dos solventes e o método é eficiente para sistemas bem definidos (GAY; COLLINS; GEBICKI, 1999; GAY; GEBICKI, 2002).

A sensibilidade é referida como sendo de grandeza nanomolar (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991; GAY; GEBICKI, 2000), isto é, cerca de 0,1 meq/kg de amostra (DOBARGANES; VELASCO, 2002).

O método é simples, de fácil aplicação, direto, rápido, sensível e não depende da presença do oxigênio (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991; BURAT; BOZKURT, 1996; GAY; COLLINS; GEBICKI, 1999; GAY; GEBICKI, 2000; GAY; GEBICKI, 2002). Os íons férricos sofrem oxidação relativamente pequena durante a incubação, não interferindo nos resultados (GRAU et al., 2000). No entanto, recomenda-se confirmar a presença de hidroperóxidos com pré-tratamento enzimático (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991). Há relatos da utilização de catalase e trifenilfosfeno (NOUROOZ-ZADEH et al., 1995).

Tal metodologia foi aplicada na análise de óleos vegetais comestíveis (NOUROOZ-ZADEH et al., 1995), cápsulas de óleo de peixe, óleo de amêndoas, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de milho, manteiga (BURAT; BUZKURT, 1996) e frango (GRAU et al., 2000).

O tempo de reação e o volume de extrato devem ser ajustados para a amostra a ser analisada. Carnes de frango cruas e cozidas necessitam de 30 minutos de incubação, ao passo que os materiais biológicos necessitam de 15 minutos e menos de 10 minutos são requeridos para cápsulas de óleo de peixe, óleo de amêndoas, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de milho e manteiga (BURAT; BUZKURT, 1996; GAY; COLLINS; GEBICKI, 1999; GRAU et al., 2000).

A Safety Associates é detentora de patente de *kits* rápidos de análises de alimentos e outras matrizes complexas, incluindo a determinação de peróxidos (kit *PeroxySafeTM*),

através da oxidação de Fe^{2+} na presença de xilenol laranja em solução ácida, utilizando o 2-propanol como solvente. Os resultados são expressos como meq O_2 / kg de óleo (SAFETY ASSOCIATES, 1998; 1999; 2002; 2003; 2004).

Alguns trabalhos utilizando os *kits* de determinação de peróxidos foram apresentados em congressos internacionais. Foram empregados na avaliação da qualidade de óleos de fritura e *snacks* com ou sem antioxidantes (GORDON; ALIFF; LEE, 2000; GORDON, 2000a; 2000b), óleos refinados (GORDON; MARTIN, 2000; GORDON, 2002a); amêndoas, gordura de amêndoas e barras nutricionais (GORDON, 2002b), formulações infantis (GORDON, 2001; 2002c) e óleos vegetais refinados e azeites de oliva (OSAWA et al., 2003).

Em estudos entre laboratórios, encontrou-se uma correlação de $r = 0,95$, enquanto que para a correlação com o método da AOCS, utilizando 276 amostras diferentes de óleo, o valor obtido foi de 0,99 (GORDON, MARTIN, 2000).

Recentemente, os *kits PeroxySafeTM*, assim como os *kits FaSafeTM*, de determinação de ácidos graxos livres, foram reconhecidos pela AOAC como métodos alternativos (GORDON, 2004), com os respectivos números de certificados, 030405 (SAFTEST, 2003a) e 030501 (SAFTEST, 2003b). No entanto, faltam estudos conclusivos, envolvendo análises estatísticas detalhadas, para que se confirme a correlação existente com a metodologia da AOCS (Cd 8b-90) e, conseqüentemente, se divulgue o novo método como uma alternativa eficaz, perante o meio científico e empresas do segmento alimentício, que têm a vida útil de seus produtos definida pela oxidação de lipídios.

O presente estudo teve como objetivo validar os *kits* de determinação de índice de peróxido DiaMed F.A.T.S. (*PeroxySafeTM HSY* e *PeroxySafeTM STD*, respectivamente de alta sensibilidade e padrão), aplicados a óleos vegetais refinados e azeites de oliva, correlacionando seus resultados com os resultados obtidos pela metodologia oficial da AOCS para determinação de índice de peróxido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

2.1.1 *kit PeroxySafe*TM HSY (de 0 a 2 meq/kg)

Foram utilizadas 21 amostras de óleos vegetais refinados (arroz, algodão, canola, girassol, milho, soja e composto de soja e azeite de oliva), banha e gorduras hidrogenadas, adquiridas no comércio local e mantidas em local seco e fresco. As embalagens permaneceram lacradas até os dias de análises, iniciando-se pela metodologia oficial e no dia seguinte, prosseguiu-se com a análise com o *kit PeroxySafe*TM HSY, sendo que nesse período, as embalagens foram fechadas com parafina, no caso das latas.

2.1.2 *kit PeroxySafe STD*TM (acima de 1 meq/kg)

Foram utilizadas no total 20 amostras, entre óleos de soja vencidos e azeites não vencidos, adquiridas no comércio local e mantidas em local seco e fresco. Similarmente ao item 2.1.1, iniciaram-se as análises através do método oficial, prosseguido com as análises com o *kit PeroxySafe*TM STD. As embalagens foram abertas apenas nos dias de análises, mantidas seladas com parafina (latas) no período entre as avaliações.

2.2 METODOLOGIA OFICIAL

Seguiu-se a metodologia Cd 8b-90 (AOCS, 2004). As análises foram realizadas em triplicata, utilizando material analítico apropriado e massas das amostras estabelecidas no método. A solução de tiosulfato de sódio 0,01 N foi padronizada com dicromato de potássio (padrão primário) nos dias das análises, em duplicata, segundo Morita e Assumpção (2001). Os resultados foram expressos como a média de três valores, com 5%

de tolerância para o coeficiente de variação (CV). No caso de extrema diferença entre os três valores, $CV > 5\%$, foi realizada nova duplicata e esta foi incluída nos cálculos da nova média.

2.3 KITS DIAMED (PeroxySafe™ HSY e PeroxySafe™ STD)

Os procedimentos de análise seguiram a orientação do fornecedor. As análises foram realizadas em triplicata e, no caso do valor do coeficiente de variação ultrapassar 10%, as determinações foram repetidas, em triplicata.

O teste consistiu na construção da curva de calibração (o valor de r admitido foi superior a 0,99), seguida de teste com soluções de concentrações conhecidas (controles). Uma vez aprovada a curva de calibração através dos testes dos controles, iniciaram-se os testes com as amostras. Se rejeitada, nova curva de calibração foi construída e os controles foram testados novamente.

O procedimento das análises é mostrado na Figura 1. Ver Apêndices C-1 e C-2 para maiores informações.

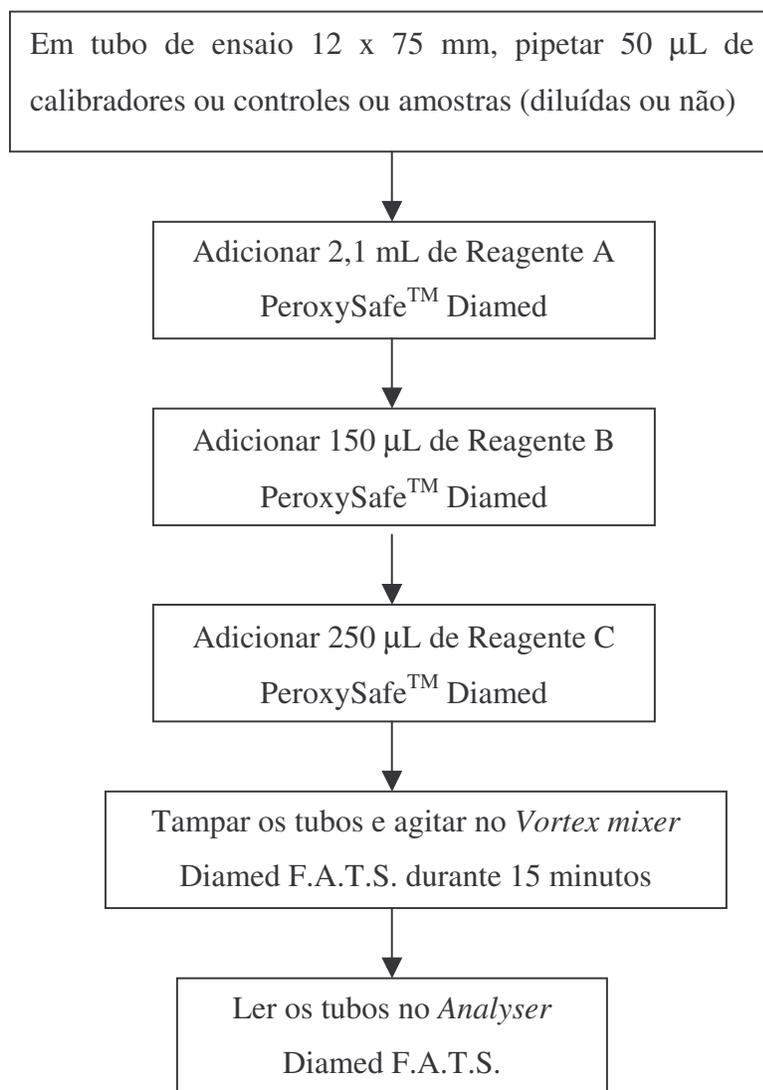


Figura 1. Fluxograma do procedimento das análises de determinação de peróxidos utilizando os *kits* PeroxySafe™ de determinação de Índice de Peróxido, segundo instruções do fabricante.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente, foram avaliados alguns parâmetros da estatística básica: média entre as repetições, desvio padrão, coeficiente de variação, diferença relativa entre dois valores, pontos de máximo e de mínimo.

Posteriormente, foi feita a análise de regressão linear para comparar os valores obtidos de índice de peróxido, expressos em meq/kg, através dos *kits* Diamed e os valores obtidos pelo método oficial.

Utilizou-se o programa *Minitab for Windows* versão 12.1 (MINITAB USER'S GUIDE, 1994; MINITAB REFERENCE GUIDE, 1994; RYAN JÚNIOR; JOINER; RYAN, 1976) para a obtenção da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (MONTGOMERY, 1991; COSTA NETO, 1992; MONTGOMERY; PECK, 1992), assim como as bandas de 95% de confiança e de predição (CHARNET et al., 1999).

Prosseguiu-se com os testes da regressão, do coeficiente de correlação, da inclinação (igual a 1) e do intercepto (igual a 0) (MATNER et al., 1990; MONTGOMERY, 1991; COSTA NETO, 1992; MONTGOMERY; PECK, 1992).

Além da regressão linear, foi feita a Análise de Variância, utilizando o *software SAS for Windows V 8* (COUNCIL, 1985).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 *kit* PeroxySafe™ STD – óleos de soja e azeites

Segundo a Figura 2, os valores de peróxidos obtidos através do método oficial e do *kit* PeroxySafe™ STD variaram de 0,9 a 11,1 meq/kg (CV = 0,6-5,0%) e 1,4 a 12,2 meq/kg (CV = 0,3-9,6%), respectivamente, para amostras de óleos de soja e azeites (Apêndice G-1).

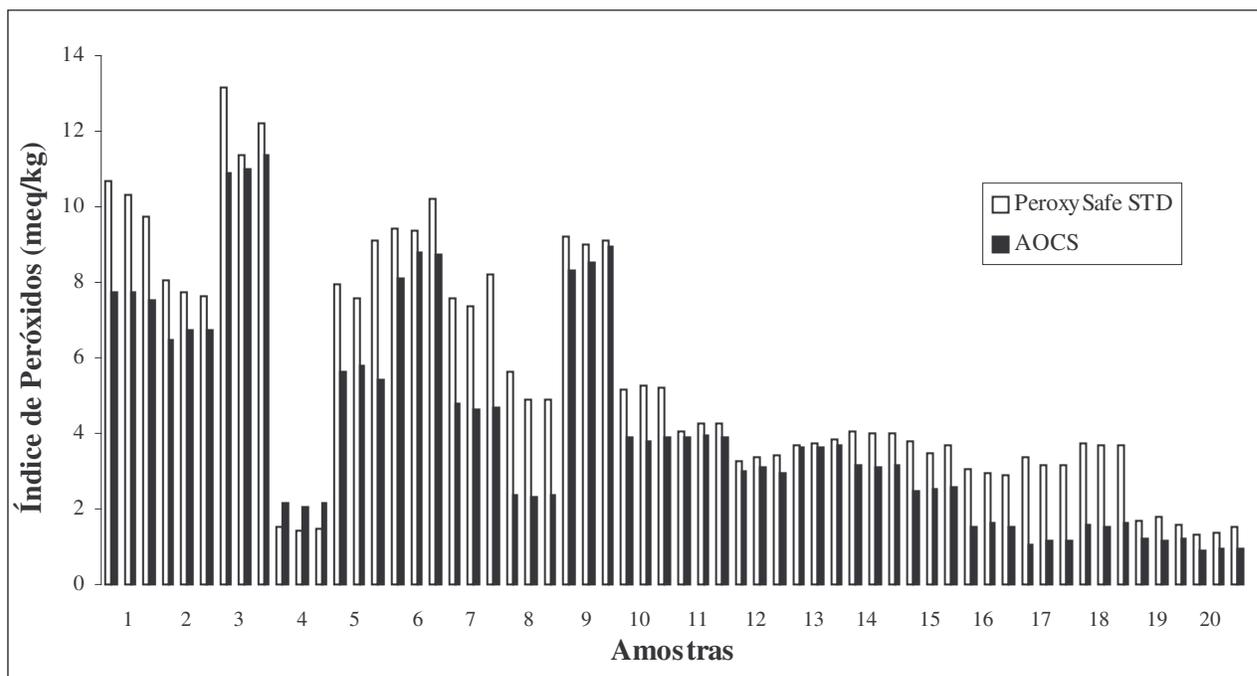


Figura 2. Gráfico ilustrativo dos valores de IP, em meq/kg, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, em triplicada, para amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.

Apesar dos prazos de validade vencidos, os óleos de soja estavam com valores de índice de peróxido inferiores ao limite estabelecido pela Resolução nº 482 (BRASIL, 2000), 10 meq/kg, detectados por ambas as metodologias.

Quanto aos azeites de oliva, também estavam conforme a mesma norma regulamentadora, com valores inferiores a 20 meq/kg para ambas as metodologias.

As diferenças entre os valores de IP obtidos pelo *kit* e pelo método oficial estão ilustradas na Figura 3.

Nota-se que as maiores diferenças relativas se deram para os valores de peróxidos inferiores a 2 meq/kg pelo método oficial (Figura 4). Isso equivale a dizer que as diferenças foram maiores quando o volume gasto de titulante foi inferior a 1,5 mL, chegando a cerca de 220% (Figura 3).

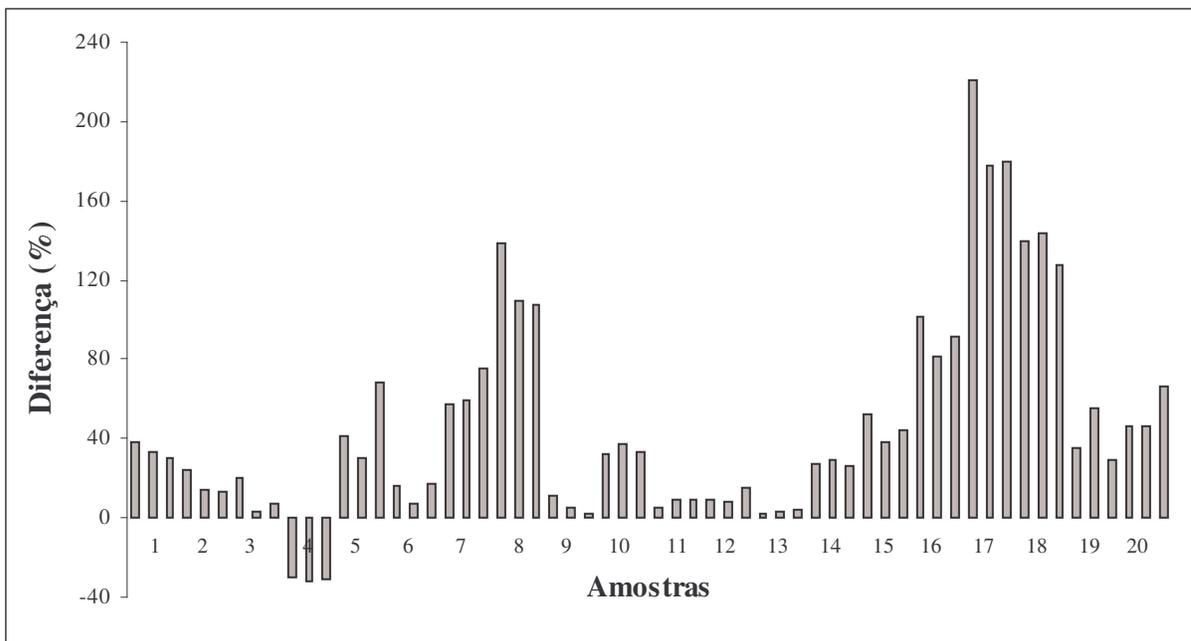


Figura 3. Diferença, em %, entre os valores de índice de peróxido obtidos através do *kit* PeroxySafe™ STD e pelo método AOCS Cd 8b-90 para amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.

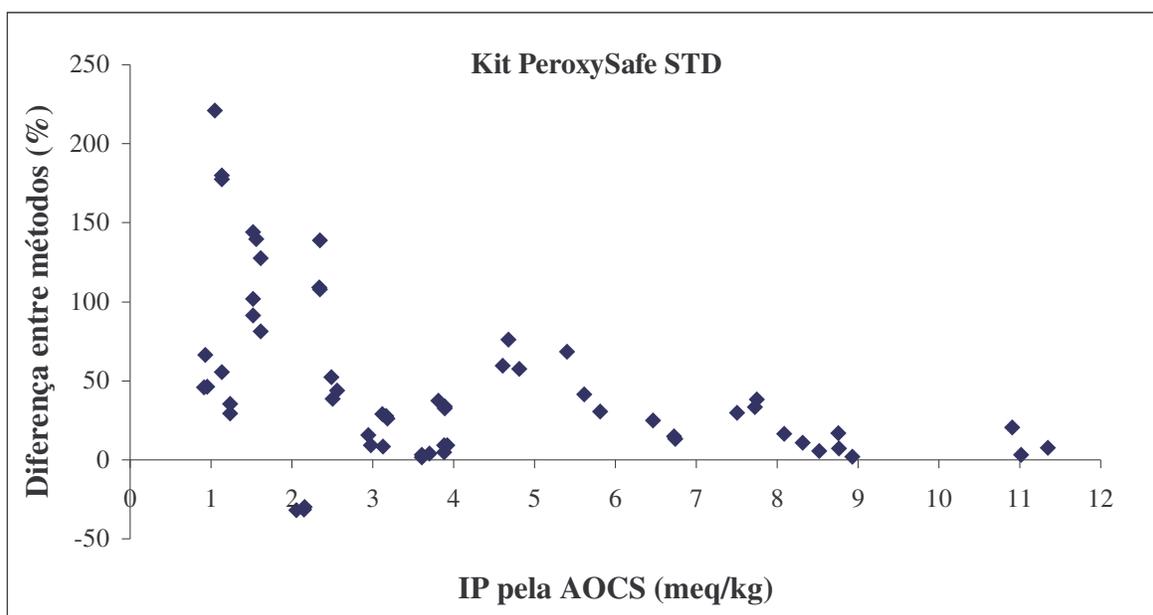


Figura 4. Gráfico da diferença entre os métodos, em %, e o Índice de Peróxido, obtido pela AOCS Cd 8b-90 para amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.

3.1.1 Análise do modelo

A correlação entre as metodologias pode ser representada pela equação $y = 1,11 + 1,03 x$, com coeficiente de correlação foi de 0,94, respondendo por 89% da variação do IP obtido pelo *kit* (Figura 5).

Testando os valores de intercepto e inclinação, o primeiro não equivale a 0 ($\alpha = 1$ e 5%), enquanto que o segundo equivale a 1 ($\alpha = 1$ e 5%).

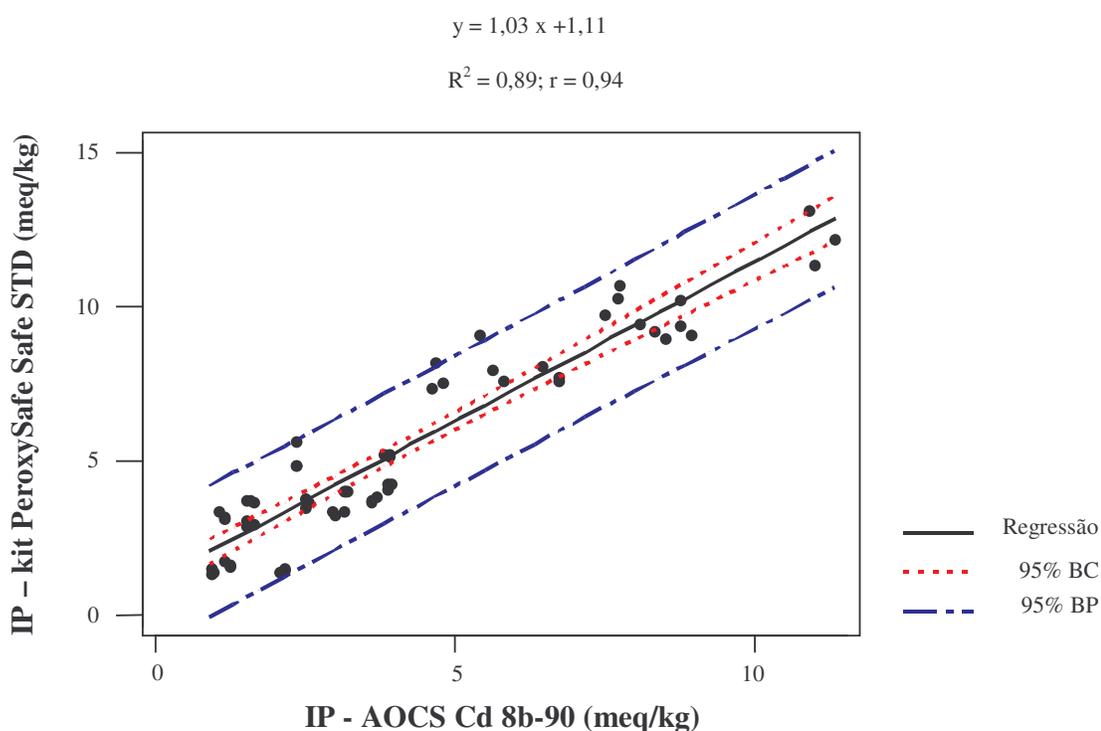


Figura 5. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de azeites e óleos de soja vencidos, obtidos pelo *kit* PeroxySafeTM STD e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

De acordo com a Tabela 1, o modelo de regressão foi significativo ($F_{\text{Calc}} > F_{\text{Tab}}$).

Tabela 1. ANOVA para a regressão linear - *kit PeroxySafe*TM STD.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab}	P
Regressão	522,51	1	522,51	478,49	4,00 ($\alpha = 5\%$)	0,000
Erro Residual	63,34	58	1,09			
Total	585,85	59				

3.1.2 Comparação de médias

Comparando os resultados de IP gerados por ambas as metodologias, houve diferença significativa entre as metodologias, ao nível de 5 e 1% de significância (Tabela 2). No entanto, é de se esperar que, embora a hipótese de inclinação igual a 1 tenha sido aceita, os resultados observados podem não equivaler a unidade, se se considerar o erro experimental, sendo necessário o emprego de fatores de correção.

Tabela 2. ANOVA para a comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM STD.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	46,94	1	46,94	134,35	6,97 ($\alpha = 1\%$)	< 0,0001
Amostras	1039,79	19	54,73		3,96 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	34,59	99	0,35			
Total	1121,32	119				

Por tentativa e erro, os valores obtidos pelo *kit* foram multiplicados por fatores de correção, de forma a não haver diferença significativa entre os valores obtidos.

Como resultado final, chegou-se ao fator de correção 0,80 que, quando aplicado aos resultados obtidos pelo *kit*, fez com que os valores gerados por ambas as metodologias passassem a ser equivalentes, conforme os resultados da Análise de Variância da Tabela 3.

Tabela 3. ANOVA para a comparação de médias, aplicando fator de correção de 0,80 nos resultados obtidos pelo *kit PeroxySafe*TM STD.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	0,80	1	0,80	2,70	6,97 ($\alpha = 1\%$)	0,1033
Amostras	834,12	19	43,90		3,96 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	29,36	99	0,30			
Total	864,28	119				

3.2 *kit PeroxySafe*TM HSY - óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas

Os valores de IP variaram de 1,1 a 9,4 meq/kg (CV = 0,6-7,9%) e de 0,8 a 7,0 meq/kg (CV = 0,1-5,1%), respectivamente, para as determinações com o *kit* e com o método AOCS Cd 8b-90 (Figura 6 e Apêndice G-2) para as amostras de óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas.

As diferenças entre os valores de índice de peróxido obtidos por ambas as metodologias chegaram a cerca de 180% e podem ser melhor visualizadas na Figura 7.

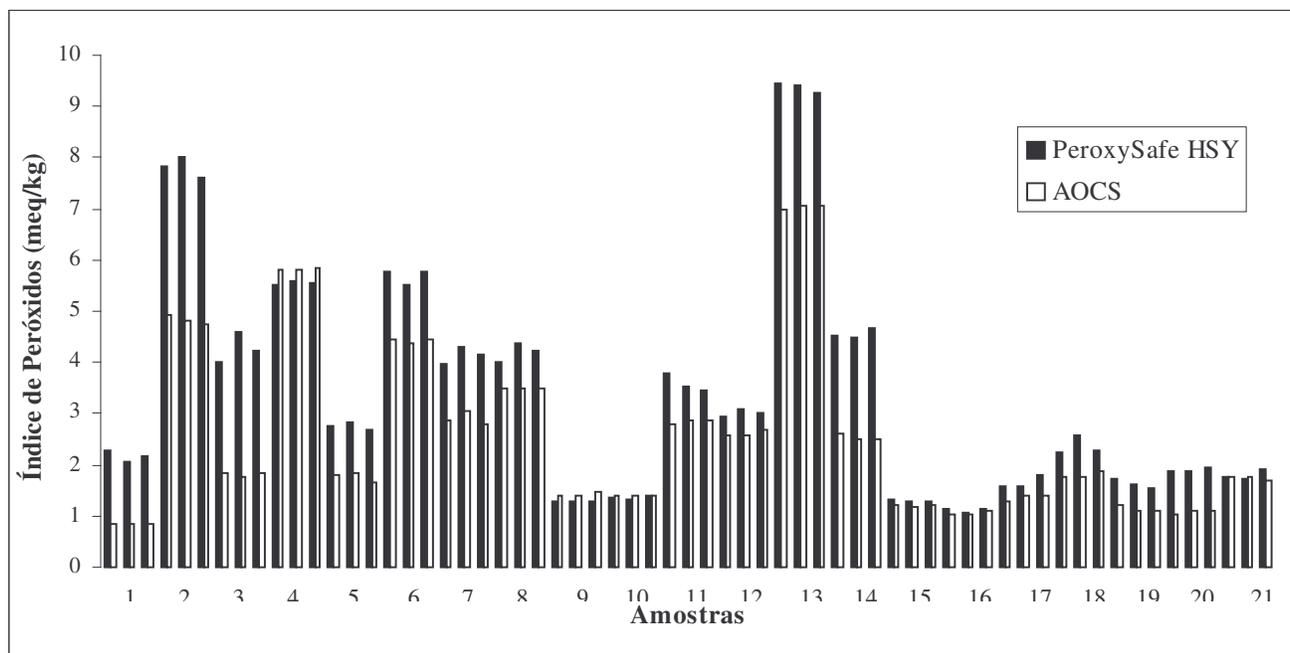


Figura 6. Gráfico ilustrativo dos valores de Índice de Peróxido, em meq/kg, obtidos pelo kit PeroxySafe™ HSY e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, em triplicata, para óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas.

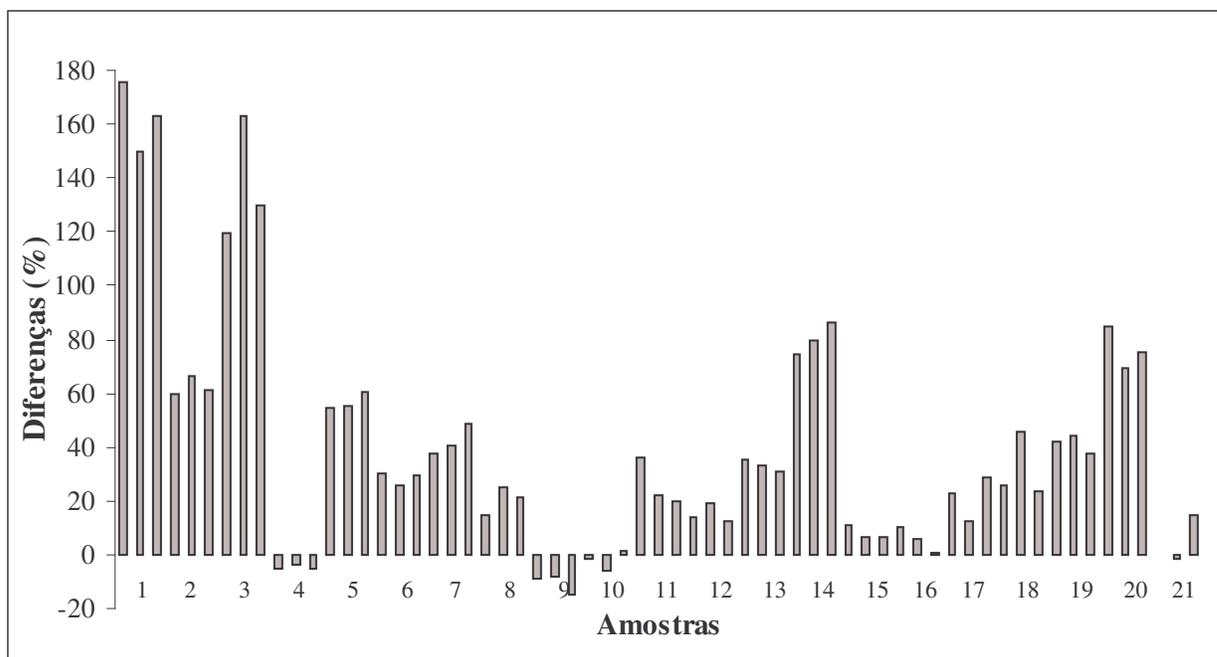


Figura 7. Diferença, em %, entre os valores de índice de peróxido, obtidos pelo kit PeroxySafe™ HSY e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 para amostras de óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas.

De forma análoga ao *kit PeroxySafe*TM STD, as maiores diferenças relativas entre os métodos se deram para índices de peróxido inferiores a 2 meq/kg, correspondentes a volumes gastos de titulante inferiores a 1,5 mL, através do método da AOCS, chegando a aproximadamente 180% (Figura 8).

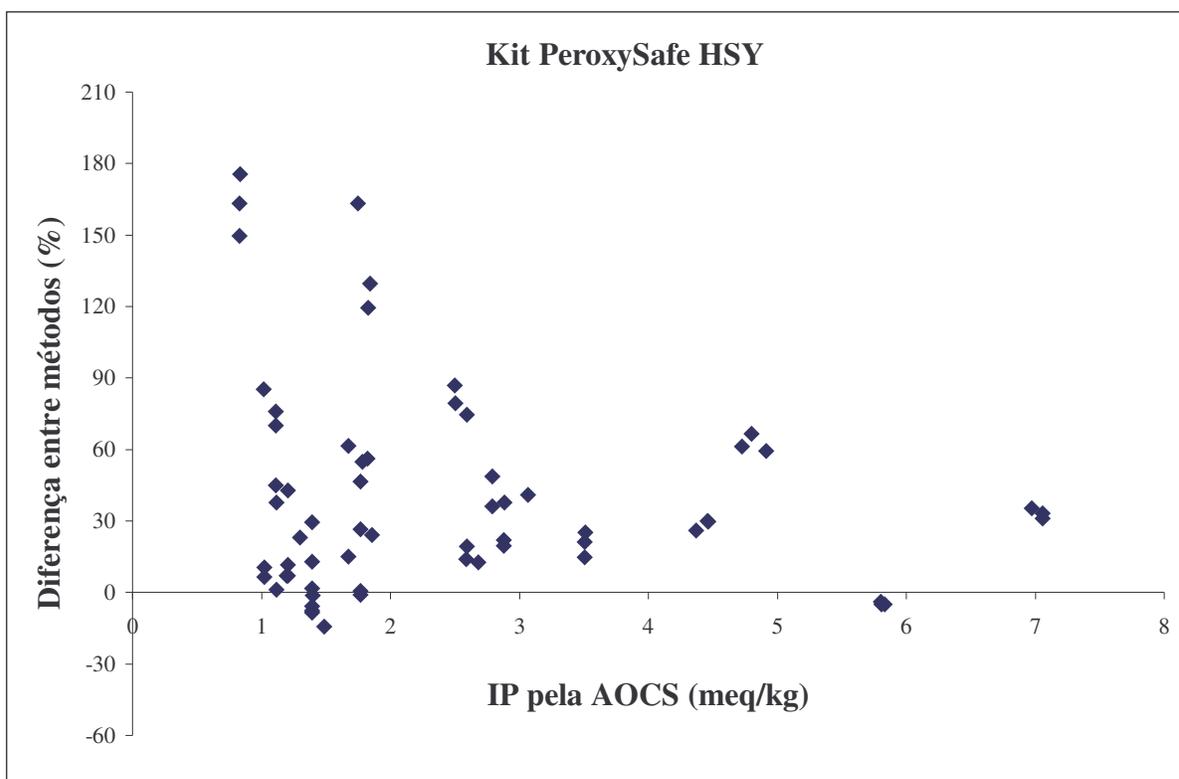


Figura 8. Relação existente entre a diferença entre os métodos, em % e o Índice de Peróxido obtido pela AOCS Cd 8b-90, para amostras de óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas.

3.2.1 Análise do modelo

A equação que expressa a relação existente entre os valores de IP obtidos pelo *kit PeroxySafe*TM HSY com os valores gerados através da metodologia oficial foi $y = 1,22 x + 0,32$, com coeficiente de correlação 0,93. Isto é, 86% da variação dos índices de peróxido obtidos pelo *kit* foi explicada pelo modelo (Figura 9).

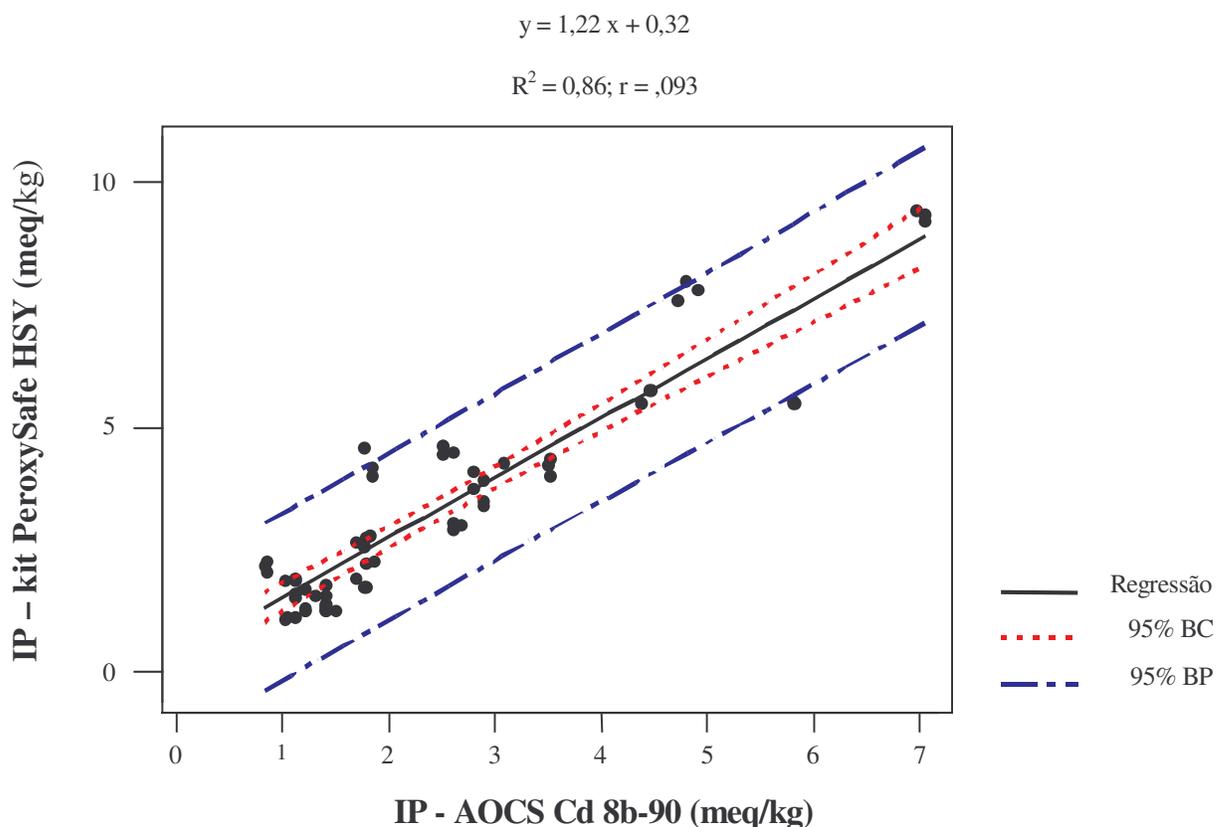


Figura 9. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas, obtidos pelo *kit PeroxySafeTM HSY* e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

Segundo os dados da Tabela 4, o modelo de regressão foi significativo ($F_{\text{Calc}} > F_{\text{Tab}}$). Já os testes de intercepto e inclinação apontaram para valores igual a 0 e diferente de 1, respectivamente, ao nível de 1 e 5% de significância.

Tabela 4. ANOVA para a regressão linear - *kit PeroxySafeTM HSY*.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F_{Calc}	F_{Tab}	p
Regressão	259,19	1	259,19	362,76	4,00 ($\alpha = 5\%$)	0,000
Erro Residual	43,58	61	0,71			
Total	302,77	62				

3.2.2 Comparação de médias

De acordo com o teste negativo da inclinação, não houve diferença significativa entre as metodologias utilizadas ao nível de 1 e 5% de significância (Tabela 5).

Tabela 5. ANOVA para comparação de médias - *kit* PeroxySafe™ HSY.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	3,38	1	3,38	0,66	6,97 ($\alpha = 1\%$)	0,4169
Amostras	714,10	20	35,70		3,96 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	528,43	104	5,08			
Total	1245,91	125				

4 CONCLUSÕES

Os *kits* PeroxySafe™ STD e PeroxySafe™ HSY utilizados nas determinações de índices de peróxido nas amostras de óleos e soja vencidos, azeites de oliva, óleos vegetais refinados, banha e gorduras hidrogenadas revelaram resultados que se correlacionaram com a metodologia oficial da AOCS (Cd 8b-90). No entanto, os valores obtidos pelo primeiro *kit* devem ser corrigidos por um fator de 0,80, de forma a equivalerem ao método por iodometria.

O volume de solução de tiosulfato de sódio 0,01 N gasto nas titulações foi de 0,45 a 3,80 mL, o que não deixa de ser pequeno, se comparado com os erros de leitura, estimados em 0,05 mL. Para ambos os *kits*, valores de peróxidos equivalente a volumes gastos de titulante inferiores a 1,5 mL (abaixo de 2 meq/kg) geraram as maiores diferenças entre as metodologias, chegando a erros de 220%. Dessa forma, na condição de se aumentar o volume gasto para valores acima de 1,5 mL, espera-se que as diferenças sejam reduzidas a valores mínimos e as metodologias sejam equivalentes, sem o emprego de fatores de correção.

De acordo com a metodologia da AOCS, para volumes tão pequenos quanto 0,50 mL, uma solução mais diluída pode ser utilizada. Como os volumes de titulante gastos

estão muito próximos a esse valor, pode-se pensar em utilizar solução de tiosulfato de sódio 0,005 N, assim como o fizeram Gutkoski (1997) e Soares Júnior (2000).

5 REFERÊNCIAS

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 2004.

BERGER, K. G. The practice of frying. **PORIM Technology**, n. 9, 1984. 30 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 482, 23 set. 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 jun. 2000. Seção 1. p. 21-25. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm>. Acesso em: 18 set. 2003. 11h27min.

BURAT, K. M.; BOZKURT, O. Improvement of calibration curve for determining peroxide values of food lipids by the modified ferrous oxidation-xylenol orange method. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 4, p. 995-997, 1996.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. 12. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1992. 264 p.

COUNCIL, K. A. Analysis of variance. In: HELWIG, J. T. (Ed.). **SAS Introductory guide**. 3 ed. Cary: SAS Institute Inc., 1985. p 55-60.

CRAPISTE, G. H.; BREVEDAN, M. I. V.; CARELLI, A. A. Oxidation of sunflower oil during storage. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 12, p. 1437-1443, 1999.

DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J. Analysis of lipid hydroperoxides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, p. 420-428, 2002.

GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p. 149-155, 1999.

_____.; GEBICKI, J. M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, v. 284, p. 217-220, 2000.

_____.; _____. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. **Analytical Biochemistry**, v. 304, p. 42-46, 2002.

GORDON, V. C. Analysis of refined oils for residual protein and lipid degradants. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002a, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002a. Disponível

em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11113.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____. Emerging new techniques for food quality assessment. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS (IFT) ANNUAL MEETING, 2000a. **Resumos...** Institute of Food Technologists, 2000.

_____. Evaluation of antioxidant efficacy in treated and untreated oils and snacks using rapid membrane separation technology. In: IFT ANNUAL MEETING, 2000b, Dallas. **Anais eletrônicos...** Dallas, 2000. Disponível em: <<http://ift.confex.com/ift/2000/techprogram/>>. Acesso em 22: jul. 2003. 15h43min.

_____. Fat content and fat quality in nuts and nut butters. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002b. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11120.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____. Micro-analytical membrane technology to evaluate infant formula quality and monitor shelf life of infant formulas. In: IFT ANNUAL MEETING, 2001, New Orleans. **Anais eletrônicos...** New Orleans, 2001. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/meeting_2001.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 15h42min.

_____. **Publicação eletrônica** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <cibelec@fea.unicamp.br> em 20 jan. 2004.

_____. Quality and stability testing of infant formulas. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002c, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002c. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11113.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____.; ALIFF, S.; LEE, H. Monitoring frying oils and fried food products using a membrane separation system. In: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS) ANNUAL MEETING – FRYING OIL QUALITY II SESSION, 2000. **Resumos...** American Oil Chemists' Society, 2000.

_____.; MARTIN, D. New method using membrane separation to test refined oils for lipid peroxides (0,01 to 2,0 meq/kg), free fatty acids (0,03 to 0,3%), and antioxidant concentrations (ppm). In: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS) ANNUAL MEETING – GENERAL ANALYTICAL II SESSION, 2000. **Resumos...** American Oil Chemists' Society, 2000.

GRAU, A. et al. Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meta through a ferrous oxidation-xylene orange method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4136-4143, 2000.

GUTKOSKI, L. C. **Características tecnológicas de frações de moagem de aveia e efeito de umidade e temperatura de extrusão na sua estabilidade.** 1997. 241 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

HARTMAN, L; WHITE, M. D. L. apud MEHLENBACHER, V. C. **Analysis of fats and oils.** Champaign: Garrard, 1960. 616 p.

JIANG, Z.-Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange: comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

LAWSON, H. W. **Standards for fats & oils.** Connecticut: AVI, 1985. v. 5.

MATNER, R. R. et al. Efficacy of the Petrifilm E. coli count plates for E. coli and coliform enumeration. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 2, p. 145-150, 1990.

MEHLENBACHER, V. C. **Analysis of fats and oils.** Champaign: Garrard, 1960. 616 p.

MINITAB USER'S GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. 285 p.

MINITAB REFERENCE GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. v. 1.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments.** 3 ed. Singapore: John Wiley, 1991. 649 p.

_____; PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis.** 2 ed. New York: John Wiley, 1992. 527 p.

MORITA, R.; ASSUMPCÃO, R. M. **Manual de soluções, reagentes e solventes:** padronização, preparação, purificação. 11 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 629 p.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O. R.(Ed.). **Food chemistry.** 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p 225-320.

NOUROOZ-ZADEH, J. et al. Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylenol orange assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 17-21, 1995.

OSAWA, C. C. et al. Resultados preliminares de novos estudos do sistema Diamed F.A.T.S. na determinação do índice de peróxido (PV) e ácidos graxos livres (AGL) de óleos refinados, óleos degomados e azeites de oliva. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL “TENDÊNCIAS E INOVAÇÕES EM TECNOLOGIA DE ÓLEOS E GORDURAS”, 2003, Campinas. **Resumos...** Campinas: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 2003. 1 CD-ROM. Word for Windows.

RYAN JÚNIOR, T. A.; JOINER, B. L.; RYAN, B. F. **Minitab student handbook**. Massachusetts: Duxbury, 1976. 337 p.

SAFETY ASSOCIATES. Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John Sorensen, John F. Elias, Virginia C. Gordon. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. CA n. PI 2267226, 30 set. 1997, 09 abr. 1998.

_____. John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi, Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 4197235, 27 fev. 2004, 07 out. 2004.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. AU n. PI 759265, 21 out. 1998, 29 abr. 1999.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 3064423, 26 mar. 2003, 03 abr. 2003.

_____. Virginia C. Gordon, John Sorensen, Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. US n. PI 6489132, 02 set. 1999, 03 dez. 2002.

SAFTEST. **Certificate n° 030405**: FaSafe™ Standard test kit. Arizona: SafTest Inc, 2003a. Disponível em: <<http://www.aoac.org/testkits/certificates/030501certificate.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2004. 12h41min.

_____. **Certificate n° 030501**: PeroxySafe™ Standard test kit. Arizona: SafTest Inc, 2003b. Disponível em: <<http://www.aoac.org/testkits/certificates/030405certificate.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2004. 12h41min.

SOARES JÚNIOR, M. S. **Características físicas e valor biológico de rações aquáticas elaboradas em extrusor de dupla rosca com diferentes níveis de substitutos de farelo de soja pela soja integral**. 2000. 167 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

YIN, H.; PORTER, N. A. Specificity of the ferrous oxidation of xylenol orange assay: analysis of autoxidation precursors of cholesteryl arachidonate. **Analytical Biochemistry**, v. 313, p. 319-326, 2003.

6 AGRADECIMENTOS

À DiaMed AG (Suíça) pelo financiamento da pesquisa e fornecimento dos kits.

CAPÍTULO 4 - Alterações no método oficial de determinação de peróxidos, baseado em iodometria, e sua correlação com kits rápidos³

RESUMO

Desde que se encontraram grandes diferenças nos estudos anteriores, correlacionando os *kits* PeroxySafeTM padrão e de alta sensibilidade com o método iodométrico (AOCS Cd 8b-90) para a determinação de índice de peróxido, sendo os resultados dos *kits* aproximadamente 200% mais elevados, quando foi gasto menos de 1,5 mL de titulante (IP < 2 meq/kg), adotou-se uma modificação do método oficial usando solução diluída de tiosulfato de sódio (0,005 N). Vinte amostras de óleos de soja e azeites de oliva foram testadas, assim como vinte amostras de óleos vegetais refinados. Os resultados obtidos a partir do método modificado e *kits* foram comparados utilizando Regressão Linear pelos Mínimos Quadrados e validou-se o modelo com ANOVA, resultando nas equações de regressão de $y = 0,93 x + 1,05$ ($r = 0,94$) e $y = 1,51 x + 0,50$ ($r = 0,95$), para os *kits* padrão e de alta sensibilidade, respectivamente. As médias obtidas também foram comparadas usando ANOVA, com a equivalência estabelecida com o fator de correção de 0,75 e 0,50 para os *kits* padrão e de alta sensibilidade, respectivamente. O uso de solução mais diluída não compensou a baixa sensibilidade do método oficial iodométrico, embora se assumiu que o uso de maiores volumes de titulante diminuiria a diferença. Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que os valores de peróxidos dobraram, com os *kits* gerando valores 4 vezes superiores aos valores obtidos através da modificação do método oficial.

Palavras-chaves: índice de peróxido, correlação, DiaMed F.A.T.S., método AOCS Cd 8b-90, óleos vegetais.

³Artigo de acordo com as normas de publicação da Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ABSTRACT

Since a previous study correlating the results of PeroxySafe kits of either standard or high sensitivity with the official iodometric method (AOCS Cd 8b-90) for the determination of peroxide values found great differences, with the results of the kits giving up to nearly 200% higher values, when less than 1,5 mL of titrant was used (PV < 2 meq/kg), a modification of the official method using dilute solution of sodium thiosulfate (0,005 N) was adopted. Twenty samples of soybean and olive oils were tested, as well as twenty samples of refined vegetable oils. The results obtained using the modified method and a kit were compared using Least Squares Linear Regression, and the model was validated using an ANOVA, yielding regression equations of $y = 0.93 x + 1.05$ ($r = 0.94$) and $y = 1.51 x + 0.50$ ($r = 0.95$) for the standard and high sensitivity kits, respectively. The averages obtained were also compared using an ANOVA, with equivalence being established using corrective factor of 0.75 and 0.50 for the standard and high sensitivity kits, respectively. The low sensitivity of the official iodometric method was not compensated for by the use of a more dilute solution, although it was assumed that the use of a larger volume of titrant would lead to a smaller difference. The results obtained here revealed that the peroxide values had doubled, with the kits giving up to 4 times those obtained using the modification of the official method.

Keywords: peroxide value, correlation, DiaMed F.A.T.S., AOCS Cd 8b-90 method, vegetable oils.

1 INTRODUÇÃO

A causa mais comum da deterioração de óleos é a rancidez oxidativa e os produtos iniciais formados pela oxidação do óleo são os hidroperóxidos. O método usual para quantificá-los é através do índice de peróxido, dado por unidades de miliequivalentes de oxigênio por massa, em kg, de óleo (HAMILTON; ROSSELL, 1986; HAHM; MIN, 1995; NIELSEN, 1998).

Os hidroperóxidos podem ser medidos através de iodometria, técnica baseada na habilidade de liberar iodo a partir de iodeto de potássio e pela oxidação de ferro a íons férrico ou, ainda, através de reações enzimáticas, métodos físicos ou técnicas cromatográficas (DOBARGANES; VELASCO, 2002).

Os métodos oficiais da AOCS Cd 8-53 e Cd 8b-90 (AOCS, 2004) são baseados na iodometria, enquanto que os *kits* PeroxySafe™ DiaMed F.A.T.S. (SAFETY ASSOCIATES, 1998; 1999; 2002; 2003; 2004) fundamentam-se na oxidação de ferro a íons férrico na presença de xilenol laranja em solução ácida.

Recentemente, os *kits* PeroxySafe™ foram validados pela AOAC (SAFTEST, 2003a), assim como o foram os *kits* de determinação de ácidos graxos livres FaSafe™ (SAFTEST, 2003b).

Trabalhos utilizando os *kits* PeroxySafe™ foram apresentados em congressos internacionais na avaliação da qualidade de óleos de fritura e *snacks* com ou sem antioxidantes (GORDON; ALIFF; LEE, 2000; GORDON, 2000a; 2000b), óleos refinados (GORDON; MARTIN, 2000; GORDON, 2002a); amêndoas e barras nutricionais (GORDON, 2002b), formulações infantis (GORDON, 2001; 2002c) e óleos vegetais refinados, degomados e azeites de oliva (OSAWA et al., 2003). Em estudo interlaboratorial, a correlação foi de $r = 0,95$, enquanto que a correlação com o método da AOCS foi de 0,99, utilizando 276 amostras de óleo (GORDON, MARTIN, 2000).

No Capítulo 3, observou-se que para valores de peróxidos inferiores a 2 meq/kg (método oficial), as diferenças entre os resultados fornecidos método oficial e pelos *kits* PeroxySafe™ foram as mais elevadas, chegando a 230%. Para tais valores, os volumes gastos de titulante foram inferiores a 1,5 mL, levando a crer que os erros de leitura da bureta influenciaram de forma significativa no valor final de peróxidos, sendo estes os

responsáveis pelas diferenças observadas. Dessa forma, ao utilizar solução mais diluída de tiosulfato de sódio, a solução titulante, maiores quantidades de volume seriam gastos e, conseqüentemente, as diferenças nos valores obtidos por ambas as metodologias poderiam ser minimizadas. Em dois estudos (GUTKOSKI, 1997; SOARES JÚNIOR, 2000), a solução utilizada foi de 0,005 N, ao invés de 0,01 N, como recomenda o método oficial (AOCS, 2004). Além disso, o método admite o uso de solução titulante de 0,001 N, sob determinadas condições.

O presente estudo teve como objetivo correlacionar os *kits* PeroxySafe™ com o método oficial AOCS Cd 8b-90 (AOCS, 2004), empregando solução de tiosulfato de sódio 0,005 N, na avaliação de óleos vegetais e azeites de oliva.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Foram utilizadas 20 amostras de óleos vegetais refinados para os estudos com o *kit* PeroxySafe™ HSY (Apêndice H-2) e outras 20 amostras de óleos vegetais vencidos e azeites de oliva (Apêndice H-1), para o *kit* PeroxySafe™ STD. Todas as amostras foram adquiridas no comércio local e mantidas em local seco e fresco. As embalagens permaneceram lacradas até os dias de análises, iniciando-se pela metodologia oficial, prosseguindo-se no dia seguinte com as determinações com os respectivos *kits*, sendo que nesse período, as latas foram fechadas com parafina.

2.2 METODOLOGIA OFICIAL

Adotou-se a metodologia AOCS Cd 8b-90 (AOCS, 2004) com solução titulante mais diluída. As análises foram realizadas em triplicata, utilizando material analítico apropriado e massas das amostras conforme indicação (AOCS, 2004). Foi utilizada solução de tiosulfato de sódio 0,005 N, segundo Gutkoski (1997) e Soares Júnior (2000),

padronizada com dicromato de potássio (padrão primário) nos dias das análises, em duplicata, segundo Morita e Assumpção (2001). Os resultados foram expressos como a média dos três dados, com 5% de tolerância para o coeficiente de variação (CV). No caso de extrema diferença entre os três valores, $CV > 5\%$, foi realizada nova duplicata e esta foi incluída nos cálculos da nova média.

2.3 KITS DIAMED (PeroxySafe™ HSY e PeroxySafe™ STD)

Seguiram-se os procedimentos de análise segundo orientação do fornecedor (Apêndices C-1 e C-2), em triplicata. No caso de valores de coeficiente de variação superiores a 10%, as determinações foram repetidas, em triplicata.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente, foram avaliados alguns parâmetros da estatística básica: média entre as repetições, desvio padrão, coeficiente de variação, diferença relativa entre dois valores, pontos de máximo e de mínimo.

Posteriormente, foi feita a análise de regressão linear para comparar os valores obtidos para peróxidos, expressos em meq/kg, através dos *kits* Diamed e os valores obtidos pelo método oficial.

Utilizou-se o programa *Minitab for Windows* versão 12.1 (MINITAB USER'S GUIDE, 1994; MINITAB REFERENCE GUIDE, 1994; RYAN JÚNIOR; JOINER; RYAN, 1976) para a obtenção da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (MONTGOMERY, 1991; COSTA NETO, 1992; MONTGOMERY; PECK, 1992), assim como as bandas de 95% confiança e de predição (MONTGOMERY; PECK, 1992; CHARNET et al., 1999).

Além da regressão linear, foi feita a Análise de Variância, utilizando o *software SAS for Windows V 8* (COUNCIL, 1985).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de óleos de soja vencidos e azeites apresentaram valores de peróxidos de 1,04 a 6,45 meq/kg e de 0,3 a 5,95 meq/kg, respectivamente, pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pelo método oficial modificado (Apêndice H-1), enquanto que as amostras de óleos vegetais refinados apresentaram valores de peróxidos de 0,64 a 8,35 meq/kg através do *kit* PeroxySafe™ HSY e de 0,19 a 4,78 meq/kg pelo método oficial modificado (Apêndice H-2). Tais valores estão dentro dos limites estabelecidos pela Resolução nº 482 (BRASIL, 2000).

As diferenças relativas entre os índices de peróxido fornecidos por ambas as metodologias estão ilustradas nas Figuras 1 e 2.

Para o *kit* STD (Figura 1), as diferenças variaram de -67,8 a 422,5% e, para o *kit* HSY, de 0,3 a 342,9% (Figura 2).

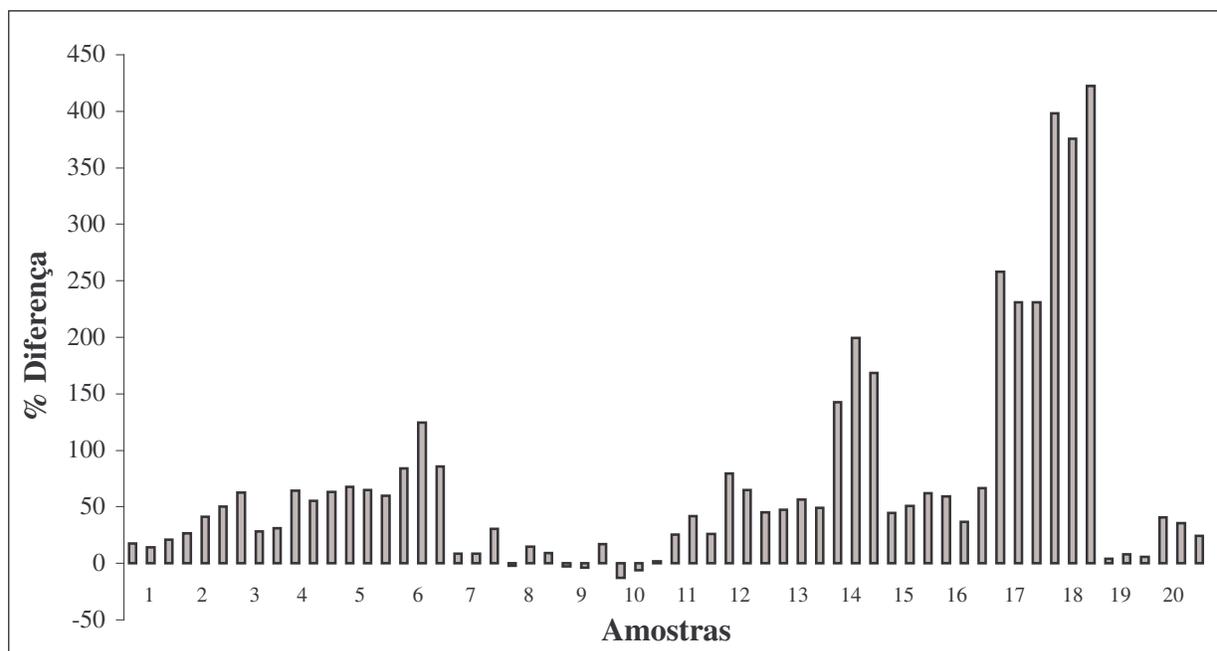


Figura 1. Diferença, em %, entre os valores de índice de peróxido obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pelo método AOCS Cd 8b-90 modificado para amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.

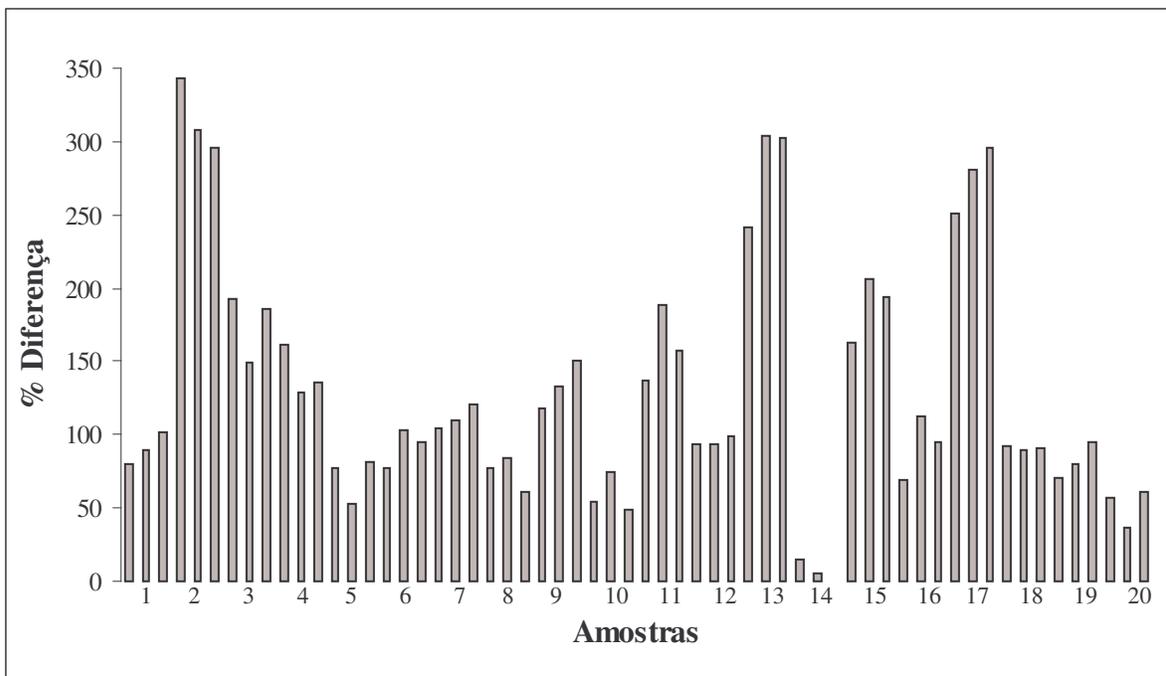


Figura 2. Diferença, em %, entre os valores de índice de peróxido, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ HSY e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 modificada para amostras de óleos vegetais refinados.

A relação existente entre a diferença relativa entre os índices de peróxido obtidos pelos dois métodos e os índices de peróxido gerados através do método oficial modificado é melhor visualizada nas Figuras 3 e 4. As diferenças máximas atingidas foram de aproximadamente 420% e 350%, respectivamente, cerca de 2 vezes as diferenças obtidas no Capítulo 3.

De modo similar aos gráficos obtidos no Capítulo 3, as maiores diferenças se deram para valores de peróxidos inferiores a 2 meq/kg (Figuras 3 e 4).

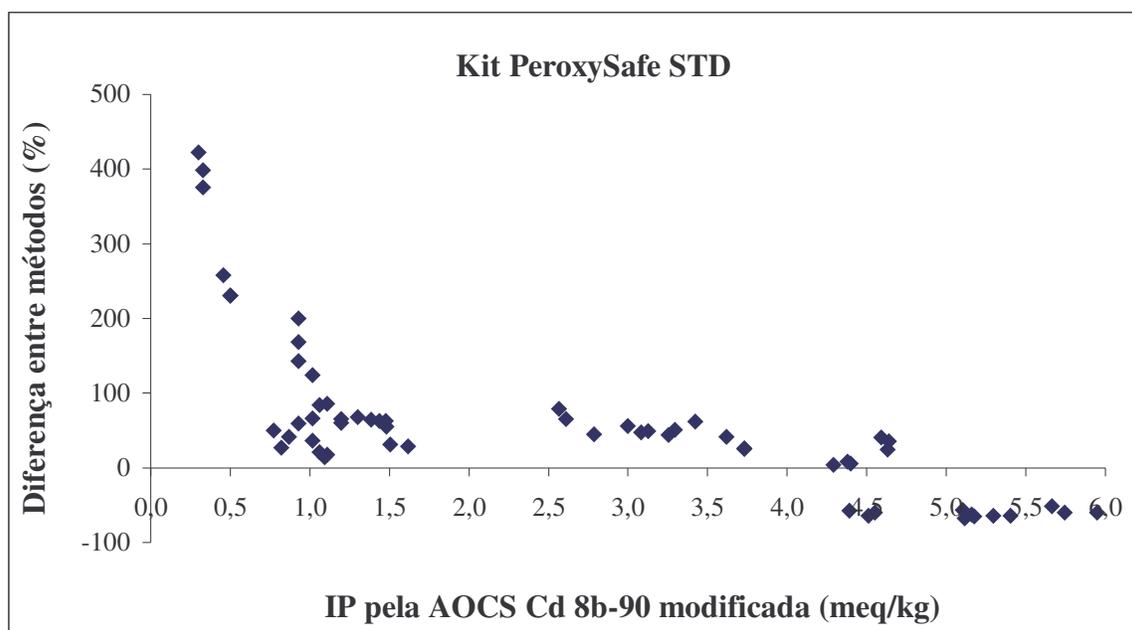


Figura 3. Relação entre a diferença relativa dos métodos AOCS Cd 8b-90 modificado e *kit* PeroxySafeTM STD, em %, e índice de peróxido obtido pelo método iodométrico.

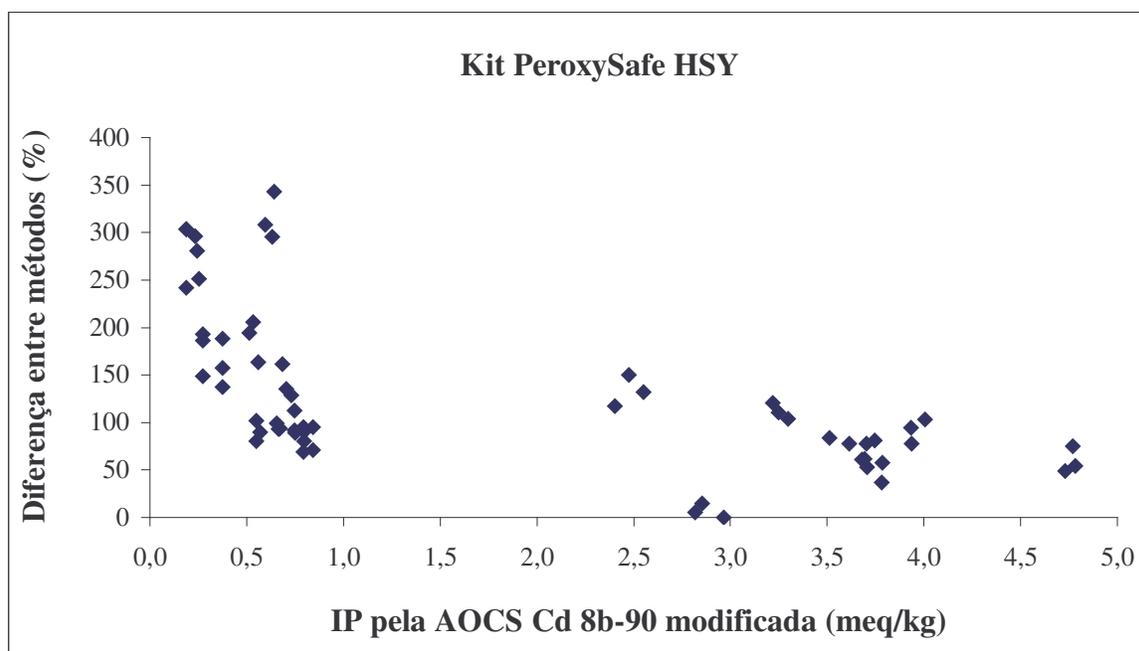


Figura 4. Relação entre a diferença relativa dos métodos AOCS Cd 8b-90 modificado e *kit* PeroxySafeTM HSY, em %, e índice de peróxido obtido pelo método iodométrico.

3.1 CORRELAÇÃO ENTRE MÉTODOS

Os gráficos de correlação, assim como as equações das retas de regressão linear, as bandas de confiança e as bandas de predição, estão ilustrados nas Figuras 5 e 6, respectivamente, para a correlação dos *kits* PeroxySafe™ STD e PeroxySafe™ HSY.

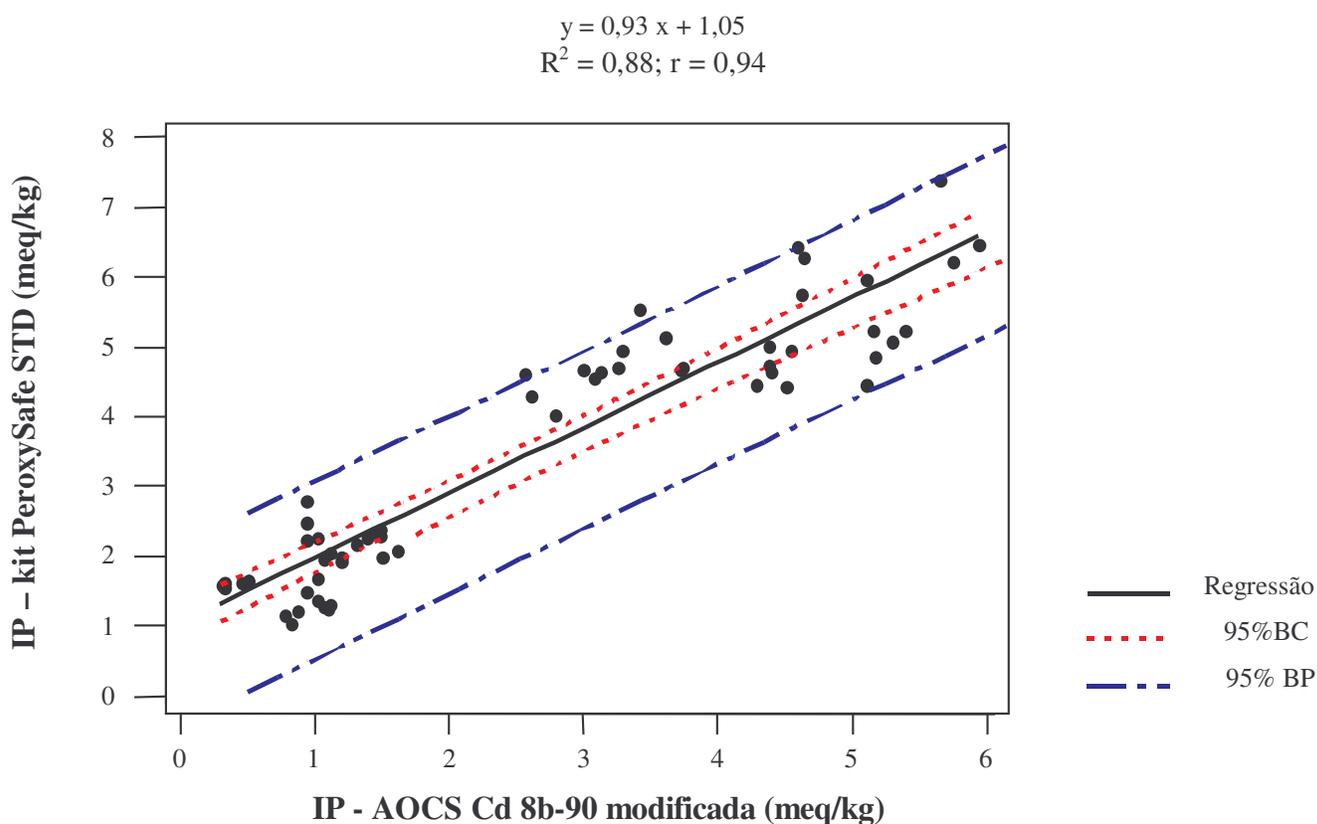


Figura 5. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de óleos de soja vencidos e azeites, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

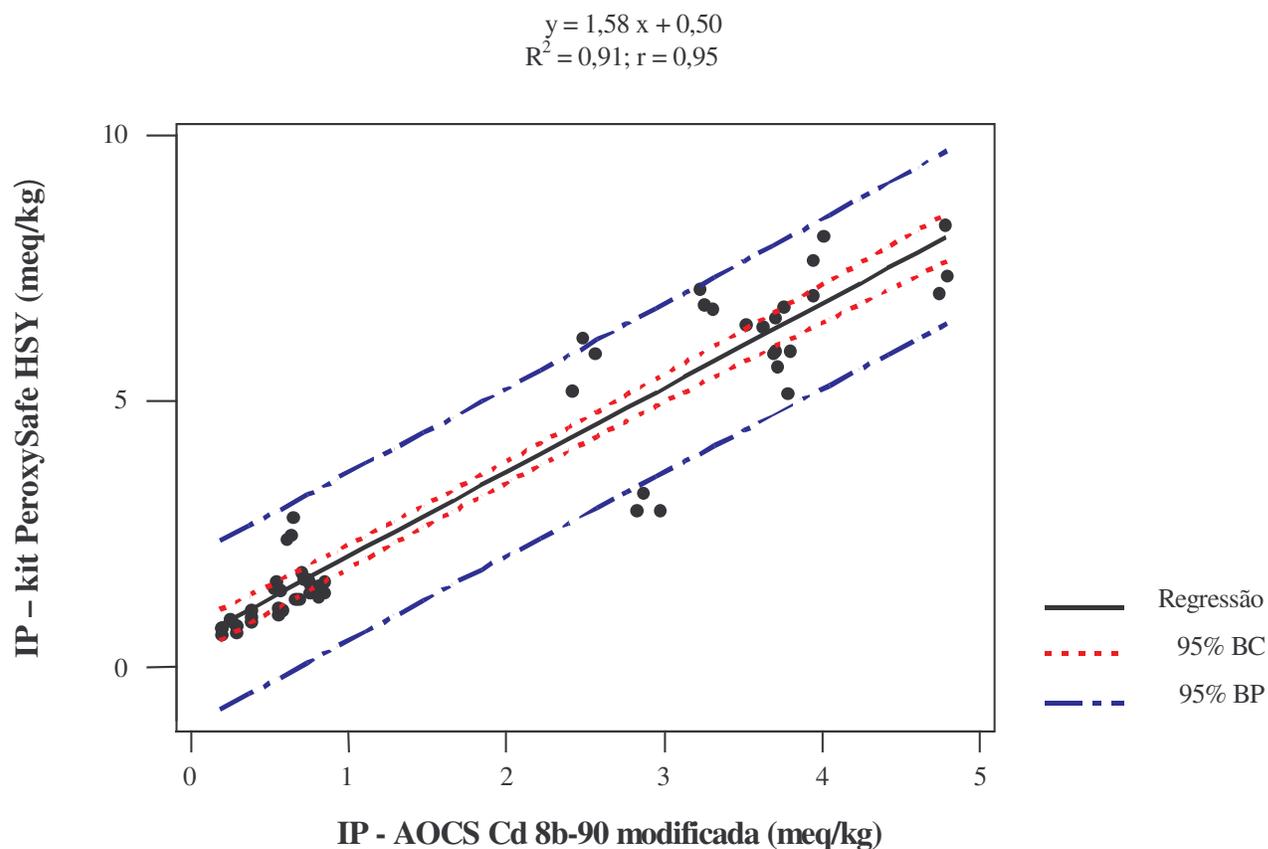


Figura 6. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de óleos vegetais refinados, obtidos pelo *kit PeroxySafe™ HSY* e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

Ambos os *kits* apresentaram correlação positiva com o método oficial modificado, conforme pode ser observado nos valores dos coeficientes de correlação de $r = 0,94$ e $0,95$ (Figuras 5 e 6), respectivamente para os *kits PeroxySafe™ STD* e *PeroxySafe™ HSY*, cujas equações foram $y = 0,93x + 1,05$ e $y = 1,51x + 0,50$.

As Tabelas 1 e 2 de ANOVA afirmam que os modelos foram adequados na predição da correlação entre métodos ($p = 0,000$).

Tabela 1. ANOVA para a regressão linear - *kit PeroxySafe*TM STD.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab}	P
Regressão	166,07	1	166,07	421,33	4,00 ($\alpha = 5\%$)	0,000
Erro Residual	22,86	58	0,39			
Total	166,07	1				

Tabela 2. ANOVA para a regressão linear - *kit PeroxySafe*TM HSY.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab}	P
Regressão	355,90	1	355,90	587,98	4,00 ($\alpha = 5\%$)	0,000
Erro Residual	35,11	58	0,61			
Total	391,00	59				

3.2 COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

3.2.1 *kit PeroxySafe*TM STD

Na comparação das médias obtidas pelas metodologias estudadas, houve diferença significativa ao nível de 1 e 5% de significância (Tabela 3), uma vez que a hipótese nula foi rejeitada ($F_{\text{Calc}} > F_{\text{Tab}}$).

Tabela 3. ANOVA para comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM STD.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	22,73	1	22,73	169,41	6,85 ($\alpha = 1\%$)	< 0,0001
Amostras	366,91	19	19,31		3,92 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	13,28	99	0,13			
Total	402,92	119				

Porém, ao avaliar o coeficiente angular da equação do gráfico de correlação (Figura 5), verificou-se que o valor foi de 0,93 e o coeficiente linear foi diferente de zero (1,05), isto é, a relação entre os métodos não é de 1:1 e o erro experimental pode ter contribuído para que houvesse a diferença encontrada. Sendo assim, por tentativa e erro, os valores

obtidos pelo *kit* foram multiplicados por um fator de correção, até que não houvesse diferença significativa entre as metodologias.

Chegou-se, então, a correção de 0,70 e 0,80 (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. ANOVA para comparação de médias - *kit* PeroxySafe™ STD, fator de correção de 0,70.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	0,92	1	0,92	5,10	6,85 ($\alpha = 1\%$)	0,0262
Amostras	265,98	19	14,00		3,92 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	17,86	99	0,18			
Total	284,76	119				

Tabela 5. ANOVA para comparação de médias - *kit* PeroxySafe™ STD, fator de correção de 0,80.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	0,90	1	0,90	6,20	6,85 ($\alpha = 1\%$)	0,0144
Amostras	297,77	19	15,67		3,92 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	14,41	99	015			
Total	313,08	119				

De acordo com os resultados das Tabelas 4 e 5, não existe diferença significativa entre os métodos ao nível de 1% de significância, quando valores de peróxidos fornecidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD forem multiplicados por 0,70 ou 0,80.

De forma a abranger todo o intervalo, recomenda-se o fator de correção médio de 0,75 para os resultados obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD.

3.2.2 *kit* PeroxySafe™ HSY

Assim como o observado para o *kit* STD, existe diferença significativa entre os métodos (Tabela 6) ao nível de 1 e 5% de significância.

Tabela 6. ANOVA para comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM HSY.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	68,97	1	68,97	156,52	6,85 ($\alpha = 1\%$)	< 0,0001
Amostras	489,38	19	25,76		3,92 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	43,63	99	0,44			
Total	601,98	119				

A Figura 6 indica que os coeficientes angular e linear da reta de correlação não são 1 e zero, respectivamente, de forma que a relação entre os valores não é de 1:1. Por tentativa e erro, chegou-se no fator de correção de 0,50 para o *kit PeroxySafe*TM HSY (Tabela 7).

Tabela 7. ANOVA para comparação de médias - *kit PeroxySafe*TM HSY, fator de correção de 0,50.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	0,40	1	0,40	4,94	6,85 ($\alpha = 1\%$)	0,0285
Amostras	231,77	19	12,20		3,92 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	7,99	99	0,08			
Total	240,16	119				

Portanto, não existe diferença significativa, ao nível de 1% de significância, entre os resultados obtidos por ambas as metodologias, quando aplicado o fator de correção de 0,5 nos resultados obtidos pelo *kit PeroxySafe*TM HSY,

4 CONCLUSÕES

Os *kits PeroxySafe*TM STD e *PeroxySafe*TM HSY correlacionaram-se com o método iodométrico de determinação de peróxidos, utilizando solução titulante mais diluída. No entanto, na comparação entre os valores gerados, o fator de correção para o *kit* de alta sensibilidade foi de 0,50, diferentemente da ausência de correção encontrada com o uso de solução 0,01 N (Capítulo 3). Já para o *kit PeroxySafe*TM STD, o fator de correção recomendado foi de 0,75, equiparando-se com a correção encontrada anteriormente (0,80).

E assim mesmo, as correções só foram possíveis, com o emprego de $\alpha = 1\%$, diferentemente do $\alpha = 5\%$ utilizado nos estudos anteriores.

Tal fato pode ser atribuído à baixa sensibilidade do método iodométrico, gerando valores menores. Aliado a isso, para valores de peróxidos equivalentes a volumes gastos de titulante inferiores a 1,5 mL ($< 2,0$ meq/kg), as diferenças entre os valores gerados por ambos os métodos foram mais elevadas, assim como foi observado no Capítulo 3, sendo que os *kits* forneceram valores mais elevados para a mesma amostra. Constatação similar obtiveram Yildiz, Wehling e Cuppett (2003) ao correlacionar o método FOX, de princípio similar aos *kits* PeroxySafeTM, com o método iodométrico AOCS Cd 8-53. Os autores concluíram que para amostras com valores de IP inferiores a 2,0 meq/kg, houve problemas de correlação, com o método oficial apresentando os menores valores observados.

A literatura explica os valores mais baixos obtidos por iodometria. O método iodométrico é altamente empírico e sua eficácia é questionável (NAWAR, 1996; NIELSEN, 1998). É ineficiente para medir adequadamente baixos valores de peróxidos (NOUROOZ-ZADEH et al., 1995), devido a dificuldades na determinação do ponto final da titulação, baixa sensibilidade e necessidade de grandes quantidades de lipídios (DOBARGANES; VELASCO, 2002; GRAY, 1978). A absorção do iodo pela insaturação dos ácidos graxos pode conduzir a um menor valor (MEHLENBACHER, 1960). Outra explicação para os valores mais baixos de peróxidos é o fato do ácido acético não proporcionar íons H^+ suficientes para a reação se completar (HARTMAN; WHITE, 1952 apud MEHLENBACHER, 1960).

Diante do ocorrido, concluiu-se que a utilização de solução titulante mais diluída não foi eficaz, visto que, embora a correlação não tenha sido prejudicada, os resultados de comparação de média foram pobres, chegando-se a fatores de correção de menor grandeza do que os obtidos no Capítulo 3. Somado-se a isso, as diferenças máximas entre as metodologias duplicaram, ao utilizar solução mais diluída.

Ainda assim, os *kits* de determinação de peróxidos DiaMed F.A.T.S. podem ser empregados satisfatoriamente na avaliação de amostras de óleos vegetais refinados e azeites, com o emprego de quantidades bastante inferiores de amostra, rapidez nas análises, menor geração de resíduos e maior praticidade.

5 REFERÊNCIAS

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 482, 23 set. 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 jun. 2000. Seção 1. p. 21-25. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm>. Acesso em: 18 set. 2003. 11h27min.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. 12. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1992. 264 p.

COUNCIL, K. A. **Analysis of variance**. In: HELWIG, J. T. (Ed.). **SAS introductory guide**. 3 ed. Cary: SAS Institute Inc., 1985. p. 55-60.

DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J. Analysis of lipid hydroperoxides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, p. 420-428, 2002.

GORDON, V. C. Analysis of refined oils for residual protein and lipid degradants. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002a, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002a. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11113.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003 14h10min.

_____. Emerging new techniques for food quality assessment. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS (IFT) ANNUAL MEETING, 2000a. **Resumos...** Institute of Food Technologists, 2000.

_____. Evaluation of antioxidant efficacy in treated and untreated oils and snacks using rapid membrane separation technology. In: IFT ANNUAL MEETING, 2000b, Dallas. **Anais eletrônicos...** Dallas, 2000. Disponível em: <<http://ift.confex.com/ift/2000/techprogram/>>. Acesso em 22: jul. 2003. 15h43min.

_____. Fat content and fat quality in nuts and nut butters. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002b. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11120.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____. Micro-analytical membrane technology to evaluate infant formula quality and monitor shelf life of infant formulas. In: IFT ANNUAL MEETING, 2001, New Orleans. **Anais eletrônicos...** New Orleans, 2001. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/meeting_2001.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 15h42min.

_____. Quality and stability testing of infant formulas. In: IFT ANNUAL MEETING, 2002c, Anaheim. **Anais eletrônicos...** Anaheim, 2002c. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11113.htm>. Acesso em: 22 jul. 2003. 14h10min.

_____.; ALIFF, S.; LEE, H. Monitoring frying oils and fried food products using a membrane separation system. In: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS) ANNUAL MEETING – FRYING OIL QUALITY II SESSION, 2000. **Resumos...** American Oil Chemists' Society, 2000.

_____.; MARTIN, D. New method using membrane separation to test refined oils for lipid peroxides (0,01 to 2,0 meq/kg), free fatty acids (0,03 to 0,3%), and antioxidant concentrations (ppm). In: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS) ANNUAL MEETING – GENERAL ANALYTICAL II SESSION, 2000. **Resumos...** American Oil Chemists' Society, 2000.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, p. 539-546, jun. 1978.

GUTKOSKI, L. C. **Características tecnológicas de frações de moagem de aveia e efeito de umidade e temperatura de extrusão na sua estabilidade**. 1997. 241 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

HAMILTON, R. J.; ROSELL, J. B (Ed.). **Analysis of oils and fats**. New York: Elsevier Applied Science, 1986, 441 p.

HAHM, T. S.; MING, D. B. Analyses of peroxide values and headspace oxygen. In: WARNER, K.; ESKIN, N. A. M. (Ed.). **Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods**. Champaign: AOCS, 1995. cap. 8.

HARTMAN, L; WHITE, M. D. L. apud MEHLENBACHER, V. C. **Analysis of fats and oils**. Champaign: Garrard, 1960. 616 p.

MEHLENBACHER, V. C. **Analysis of fats and oils**. Champaign: Garrard, 1960. 616 p.

MINITAB USER'S GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. 285 p.

MINITAB REFERENCE GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. v. 1.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3 ed. Singapore: John Wiley, 1991. 649 p.

_____.; PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis**. 2 ed. New York: John Wiley, 1992. 527 p.

MORITA, R.; ASSUMPCÃO, R. M. **Manual de soluções, reagentes e solventes:** padronização, preparação, purificação. 11 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 629 p.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O. R.(ed.). **Food chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p 225-320.

NIELSEN, S. S. **Food analysis**. 2a ed. Maryland: Aspen, 1998.

NOUROOZ-ZADEH, J. et al. Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylenol orange assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 17-21, 1995.

OSAWA, C. C. et al. Resultados preliminares de novos estudos do sistema Diamed F.A.T.S. na determinação do índice de peróxidos (PV) e ácidos graxos livres (AGL) de óleos refinados, óleos degomados e azeites de oliva. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL “TENDÊNCIAS E INOVAÇÕES EM TECNOLOGIA DE ÓLEOS E GORDURAS”, 2003, Campinas. **Resumos...** Campinas: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 2003. 1 CD-ROM. Word for Windows.

RYAN JÚNIOR, T. A.; JOINER, B. L.; RYAN, B. F. **Minitab student handbook**. Massachusetts: Duxbury, 1976. 337 p.

SAFETY ASSOCIATES. Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John Sorensen, John F. Elias, Virginia C. Gordon. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. CA n. PI 2267226, 30 set. 1997, 09 abr. 1998.

_____. John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi, Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 4197235, 27 fev. 2004, 07 out. 2004.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. AU n. PI 759265, 21 out. 1998, 29 abr. 1999.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 3064423, 26 mar. 2003, 03 abr. 2003.

_____. Virginia C. Gordon, John Sorensen, Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. US n. PI 6489132, 02 set. 1999, 03 dez. 2002.

SAFTEST. **Certificate report:** number 030405. Arizona: SafTest Inc, 2003a. Disponível em: <<http://www.aoac.org>>. Acesso em: 13 fev. 2004. 12h41min.

_____. **Certificate report:** number 030501. Arizona: SafTest Inc, 2003b. Disponível em: <<http://www.aoac.org>>. Acesso em: 13 fev. 2004. 12h41min

SOARES JÚNIOR, M. S. **Características físicas e valor biológico de rações aquáticas elaboradas em extrusor de dupla rosca com diferentes níveis de substitutos de farelo de soja pela soja integral.** 2000. 167 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

YILDIZ, G.; WEHLING, R. L.; CUPPETT, S. L. Comparison of peroxide value determination in vegetable oil using four analytical methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 2, p. 103-107, 2003.

6 AGRADECIMENTOS

À DiaMed AG (Suíça) pelo financiamento da pesquisa e fornecimento dos kits.

CAPÍTULO 5 – Utilização de metodologias rápidas (*kits*) na avaliação do óleo de fritura do Restaurante Universitário⁴

RESUMO

Alimentos fritos são frequentemente servidos em estabelecimentos de “fast-food”, porém a avaliação do óleo utilizado é bastante trabalhosa e cara e requer laboratório bem estruturado com equipamentos sofisticados. Além disso, a p-anisidina utilizada como reagente no monitoramento da concentração de alquenais em óleos de fritura é carcinogênica. Os *kits* DiaMed F.A.T.S. para determinação de alquenal (AlkalSafe STD, equivalente ao teste de p-anisidina) e malonaldeído (AldeSafe STD, equivalente ao teste de TBA) são seguros, rápidos, precisos, geram menores quantidades de resíduos que os métodos oficiais e os equipamentos necessários são compactos. Compararam-se os resultados obtidos utilizando esses *kits* com os resultados obtidos através dos métodos oficiais de determinação de alquenal (AOCS Cd 18-90) e malonaldeído (AOCS Cd 19-90) de vinte amostras coletadas do restaurante universitário durante o período de 26 de janeiro a 29 de março de 2004. Baseado na Análise de Regressão dos Mínimos Quadrados, os resultados do *kit* AlkalSafe correlacionaram-se altamente com os valores do teste de p-anisidina ($r = 0,74$), porém os resultados obtidos com o *kit* de malonaldeído não se correlacionaram com os resultados do teste de TBA. Ambos os *kits* foram significativamente mais sensíveis que os métodos oficiais, de acordo com os resultados do Teste de Tukey. Apesar dos mínimos valores de TBA das amostras analisadas, o que sugere que a inadequação do método oficial no monitoramento de óleos de fritura, a maior sensibilidade do *kit* o torna uma opção viável. Os valores de p-anisidina obtidos pelo *kit* e pelo método oficial comprovam que o óleo utilizado para frituras no restaurante universitário estava em boas condições de uso.

Palavras-chaves: óleos de fritura, fritura por imersão, anisidina, TBA, DiaMed F.A.T.S.

⁴Artigo de acordo com as normas de publicação da Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ABSTRACT

Fried foods are frequently served by fast food establishments, but the evaluation of the oil used is quite laborious and expensive, as well as requiring a well-structured laboratory with sophisticated equipment. Moreover, the p-anisidine used as a reagent in the traditional test for monitoring the alkenal concentration in frying oils is carcinogenic. DiaMed F.A.T.S. kits for the determination of alkenal (AlkalSafe STD, equivalent to p-anisidine test), and malonaldehyde (AldeSafe STD, equivalent to TBA test) are safe, as well as fast and accurate, and they generate fewer residues than the official methods; moreover, the equipment required is compact. The results obtained using these kits were compared to those using official methods for determining alkenal (AOCS Cd 18-90) and malonaldehyde (AOCS Cd 19-90) for twenty samples collected from a university restaurant during the period from January 26 to March 29, 2004. Based on Least Squares Regression Analysis, the results of the AlkalSafe kit correlated highly with those of the p-anisidine test ($r = 0.74$), but the results obtained with the malonaldehyde kit did not correlate as well with those from the TBA test. Both kits were significantly more sensitive than the official methods, as revealed by the results of a Tukey test. Although the TBA values of the samples investigated were minimal, which suggests that the official test may be inadequate for monitoring of frying oils, the greater sensitivity of the kit makes it a relatively feasible option. The p-anisidine values obtained by both kit and official method attested to the adequacy of the oil being used for frying in the university restaurant.

Keywords: frying oils, deep frying, anisidine, TBA, DiaMed F.A.T.S.

1 INTRODUÇÃO

O segmento de alimentação coletiva tem grande representatividade na economia nacional, com potencial de crescimento e geração de empregos. Segundo os dados da Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas (ABERC), as empresas do segmento movimentaram, em 2003, uma cifra superior a R\$ 5 bilhões (Tabela 1), ofereceram 160 mil empregos diretos, consumiram 2,5 mil toneladas de alimentos diariamente e geraram ao governo uma receita de R\$ 1 bilhão, entre impostos e contribuições. O mercado potencial está estimado em 23 milhões de refeições / dia para empregados de empresas e em 17 milhões nas escolas, hospitais e Forças Armadas. Já as projeções para 2004 mostram-se muito promissoras em relação aos volumes que devem ser comercializados, fato atribuído à evolução da economia nacional (OLIVEIRA, 2004).

Tabela 1. Faturamento aproximado de refeições para 1998, 1999, 2000, 2001, 2002 e 2003, em bilhões de reais.

	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Refeições Coletivas	2,8 bilhões	2,9 bilhões	3,4 bilhões	3,9 bilhões	4,2 bilhões	5,0 bilhões
Autogestão	0,7 bilhões	0,7 bilhões	0,7 bilhões	0,5 bilhões	0,5 bilhões	0,4 bilhões
Refeições Convênio	3,5 bilhões	3,2 bilhões	3,5 bilhões	3,7 bilhões	4,3 bilhões	4,5 bilhões
Cestas Básicas	1,3 bilhões	1,4 bilhões	1,6 bilhões	1,8 bilhões	2,3 bilhões	3,0 bilhões
Alimentação Convênio	1,9 bilhões	1,8 bilhões	2,0 bilhões	2,1 bilhões	2,4 bilhões	2,6 bilhões

Outro fator a ser considerado é o crescente número de mulheres trabalhando fora do lar, que passou de 23% da população economicamente ativa (PEA), em 1971, para 40% e 42%, respectivamente, em 1997 e 2001. Este índice ainda está longe dos 51% que as mulheres representam na população brasileira, e sua tendência é aumentar, assim como ocorreu nos EUA, onde 52% das refeições são feitas fora de casa, de acordo com o gerente de Economia e Estatística da Associação Brasileira da Indústria de Alimentação (ABIA), Amílcar Lacerda de Almeida (GONÇALVES, 2004).

Com o crescimento do setor, aumenta-se a preocupação com a prestação de serviços de qualidade e o fornecimento de alimentos seguros do ponto de vista microbiológico e que

atendam às expectativas do consumidor, como fatores de competitividade e atendimento aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

Tendo em vista a presença de alimentos fritos no cardápio das refeições coletivas e a inexistência de padrões no Brasil para descarte de óleo utilizado na fritura, os estabelecimentos de serviços de alimentação carecem de ferramentas de controle de qualidade que sejam rápidas, precisas, com reduzida geração de resíduos, sem a necessidade de grande infraestrutura laboratorial e que forneçam informações úteis sobre o estado oxidativo do lipídio. A fritura é um método rápido de cocção e os produtos resultantes desse processo são agradáveis do ponto de vista sensorial, tornando a sua presença indispensável em serviços de alimentação. É neste contexto que se fazem necessários os *kits* DiaMed F.A.T.S. (*Food Analysis Test System*) na avaliação dos óleos utilizados em frituras.

No presente trabalho, foram avaliadas amostras de óleos de fritura do Restaurante Universitário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), através dos *kits* AlkalSafe STDTM e AldeSafe STDTM de determinação de alquenais e malonaldeído, respectivamente, e dos métodos oficiais propostos pela AOCS, de forma a correlacioná-los.

1.1 MÉTODOS ANALÍTICOS

As análises de ácidos graxos livres (% AGL) e índice de peróxido (IP), aplicadas a óleos de fritura, são ferramentas pobres na determinação da vida útil do óleo de fritura. O primeiro tipo de análise pode fornecer alguma ajuda no julgamento das condições do óleo, indicando a extensão da hidrólise ocorrida, uma vez que os ácidos graxos livres são resultados da reação entre a água liberada dos alimentos e o óleo nas temperaturas de fritura (LAWSON, 1985; NAZ et al., 2005). Entretanto, os valores de AGL não se correlacionam com os valores de compostos polares (AL-KAHTANI, 1991).

Já o segundo, pode conduzir a um falso resultado e não reproduz as condições da fritadeira, uma vez que os peróxidos continuam a ser formados enquanto o óleo é resfriado e antes da amostra ser testada (BERGER, 1984). Por outro lado, nas temperaturas de fritura, os peróxidos podem ser formados, mas são também evaporados e deixam o sistema de

fritura nestas temperaturas elevadas. Sendo assim, é de pequena ou nenhuma significância no julgamento das condições do óleo utilizado na fritura (LAWSON, 1985).

1.1.1 TESTE DE ANISIDINA

O teste de p-anisidina detecta principalmente 2-alquenais, produtos secundários da oxidação de lipídios (WHITE, 1995). O número de anisidina é definido como 100 vezes a densidade óptica medida a 350 nm em uma cubeta de 1 cm de solução contendo 1,00 g de óleo em 100 mL de mistura de solvente e reagente. Os peróxidos presentes no óleo oxidado, de origem animal ou vegetal, são intermediários transitórios que se decompõem em vários compostos carbonílicos e outros compostos, principalmente 2,4-dienais e 2-alquenais, na presença de p-anisidina em meio ácido (AOCS, 2004).

Com o aumento da temperatura, a decomposição de hidroperóxidos é acelerada e o índice de peróxidos pode, então, ser reduzido pelo aquecimento do óleo na ausência de ar ou oxigênio (HAMILTON; RUSSELL, 1986). Dessa forma, o número de anisidina permanece praticamente constante nos primeiros estágios de oxidação, e, a partir de então, aumenta gradativamente, de acordo com a decomposição dos peróxidos (CRAPISTE; BREVEDAN; CARELLI, 1999).

O teste de p-anisidina pode ser utilizado na avaliação da deterioração do óleo durante a fritura (HOUHOULA; OREOPOULOU; TZIA, 2002), uma vez que o valor de p-anisidina tende a aumentar com o tempo de fritura/aquecimento (TOMPKINS; PERKINS, 1999), de forma linear, correlacionando-se com o tempo de fritura (LIMA; GONÇALVES, 1994). Além disso, é um teste que se correlaciona com as determinações de compostos polares (AL-KAHTANI, 1991; HOUHOULA; OREOPOULOU; TZIA, 2002), dienos conjugados (HOUHOULA; OREOPOULOU; TZIA, 2002), análise sensorial (LIST et al., 1974; THOMPCKINS; PERKINS, 1999), polímeros e com os compostos voláteis, tais como hexanal, heptanal, t-2-hexenal, t-2-heptenal, t-2-octenal e t,t-2,4-decadienal. Porém não se correlaciona com o nonanal, o único aldeído testado que é produto secundário da oxidação do ácido oléico (THOMPCKINS; PERKINS, 1999). Isso pode ser atribuído à menor taxa de

oxidação do ácido graxo oléico, se comparado com o linoléico e o linolênico (BELITZ; GROSCH, 1999).

De acordo com Houhoula, Oreopoulou e Tzia (2002), o teste de p-anisidina é um teste alternativo ao método de compostos polares, considerado trabalhoso e custoso. Já Chu (1991) acredita que é difícil avaliar a qualidade do óleo de fritura apenas com o teste de anisidina e Berger (1984) acrescenta que o seu valor não gera uma medida da deterioração progressiva do óleo, pois os produtos aldeídicos são bastante reativos e integram a polimerização.

O teste sofre a interferência de umidade, uma vez que a reação entre a p-anisidina e os aldeídos resultam na formação de água. Na presença de água em quaisquer dos reagentes ou amostras, a reação não se completa, gerando valores mais baixos. É recomendada a determinação de umidade por Karl Fischer para o ácido acético glacial e o seu teor não deve exceder 0,1% (AOCS, 2004).

1.1.2 *kits* AlkalSafe™

O *kits* AlkalSafe™ Diamed F.A.T.S. são métodos alternativos ao teste de p-anisidina (AOCS Cd 18-90), baseados na quantificação do complexo colorido formado entre alquenais e indol, com os resultados expressos em mmol/kg ou nmol/mL. De acordo com a faixa de detecção, os *kits* AlkalSafe™ são classificados como STD (“standard”) e MSA (“matrix special applications”). O primeiro compreende a faixa de 7 a 70 nmol/mL e o segundo, 1 a 70 µmol/mL.

Os *kits* MSA são destinados a matrizes complexas, onde os resultados são expressos por unidade de massa de amostra, independentemente do teor de óleo ou gordura presente na amostra. Para as análises, requerem a extração do óleo com solvente adequado, através de membrana especial (SAFETY ASSOCIATES, 1998; 1999; 2002; 2003; 2004), precedendo a reação com a solução indólica, de acordo com os procedimentos do fornecedor.

1.1.3 TESTE DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA)

De modo análogo ao teste de p-anisidina, o teste de TBA fornece o nível de aldeídos presentes no óleo. Os aldeídos correspondem a mais de 50% dos voláteis produzidos durante a oxidação de lipídios e muitos aldeídos com influência significativa no sabor são produzidos a partir da oxidação de óleo de soja (PRZYBYLSKI; ESKIN, 1995 apud TOMPKINS; PERKINS, 1999).

O número de TBA é calculado como miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (HAMILTON; RUSSELL, 1986) e se baseia na reação de cor entre o TBA e os produtos de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Figura 1).

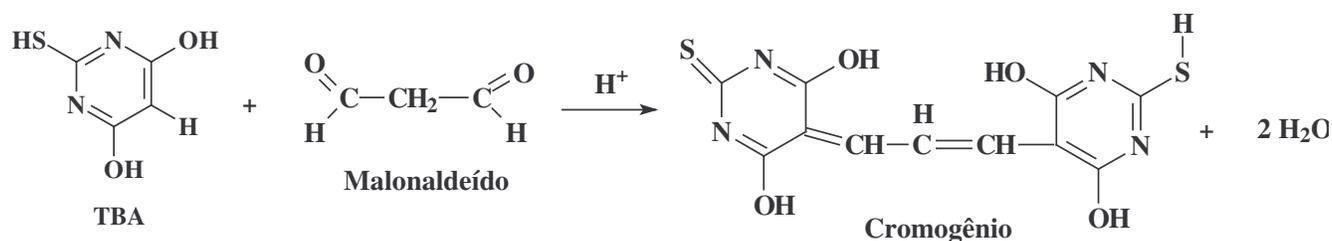


Figura 1. Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532 nm.

Quase todo tipo de alimento tem sido reportado como portador de malonaldeído (e peróxidos). Alimentos mais preocupantes são os produtos desidratados, as carnes cozidas (não curadas), as carnes estocadas e as gorduras animais e vegetais usadas na fritura industrial (ADDIS, 1986).

Resultados significativos do teste de TBA são somente obtidos pela comparação de amostras de um material único em diferentes estágios de oxidação (GRAY, 1978).

1.1.4 kits AldeSafe™

Os kits AldeSafe™ Diamed F.A.T.S. são utilizados na determinação de malonaldeído, com os resultados expressos em nmol/mL. Similares à metodologia proposta por Inoue, Ando e Kikugawa (1998), os kits fundamentam-se na reação do malonaldeído com o N-metil-2-fenilindol, formando um composto violeta na presença do ácido hidrolórico e do ácido metano-sulfônico, que absorve luz a 586 nm.

Assim como os kits AlkalSafe™, os kits AldeSafe™ são divididos de acordo com a faixa de detecção de malonaldeído em: AldeSafe™ STD (0 a 55 nmol/mL) e AldeSafe™ MSA (0 a 11 nmol/kg).

2 MATERIAL E MÉTODOS

No período de 26/01 a 29/03/2004, foram coletadas diariamente amostras do óleo de fritura do Restaurante Universitário (RU) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), antes do início da preparação das refeições do período matutino.

O RU funciona de segunda a sexta, em dois períodos: almoço e jantar. O cardápio é variado e os alimentos fritos não são muito freqüentes. No período de 2 meses (43 amostras coletadas da Fritadeira nº1, do total dos 86 expedientes de refeições servidas), em apenas 10 expedientes o prato principal era frito (Tabela 2). O RU dispõe de quatro fritadeiras elétricas, com capacidade de 200 L de óleo cada. Quando em desuso, as fritadeiras são desligadas e o óleo, em contato com a solução salina, é mantido à temperatura ambiente na própria fritadeira, protegido da luz e do oxigênio com tampa e filmes de plástico transparentes. No caso de apresentar grandes quantidades de resíduos de alimentos fritos, o óleo é filtrado e, nos finais de semana prolongados, o óleo é acondicionado em tanques, sob refrigeração.

No início do período de coletas, uma das fritadeiras (Fritadeira nº 1) foi carregada com 11 kg de sal, cerca de 70 L de água e 200 L de óleo. Já havia uma fritadeira carregada de óleo (Fritadeira nº 2) em uso por período indeterminado e as outras duas (Fritadeiras nº 3 e 4) foram carregadas em 9/02.

O óleo da Fritadeira nº 2 foi descartado em 19/02 e dela foram escolhidas 3 amostras para análises. No dia 26/02, o óleo da Fritadeira nº 1 foi misturado com o da Fritadeira nº 4 e para fins de codificação, continuou sendo denominado óleo da Fritadeira nº 1.

Até o término do período de coleta das amostras, os óleos das Fritadeiras nº 1 e 3 não tinham sido descartados.

No total, foram coletadas 73 amostras, sendo 43 da Fritadeira nº1; 8 da nº 2; 15 da nº 3 e 7 da nº 4.

As quantidades de produtos fritos, o volume de óleo gasto e o número de refeições servidas nos dias com fritura no cardápio, estão relacionados na Tabela 1. Nota-se que não se discriminou o período das refeições (se almoço ou jantar), uma vez que a coleta se deu uma vez ao dia e antes do uso do óleo.

Tabela 2. Quantidade e tipo de produto frito, volume de óleo utilizado e número de refeições servidas no restaurante universitário entre os dias 26/01 e 29/03/2004.

Data	Alimentos fritos	Quantidade (kg)	Quantidade de óleo utilizado (em L)	Número de refeições servidas
26/01	<i>steak</i> de frango	402	314	4216
28/01	frango frito	1827	126	4390
03/02	frango frito	1615	108	4571
09/02	lingüiça acebolada	886	540	5070
26/02	<i>nuggets</i>	480	388	4167
27/02	<i>nuggets</i>	124	252	4950
01/03	almôndegas ao molho	964	432	5870
02/03	almôndegas ao molho	184	144	5999
16/03	peixe frito	1580	306	6434

De acordo com as datas em que houve fritura no cardápio (Tabela 2), foram escolhidas 20 amostras (Tabela 3) para as determinações de alquenais e malonaldeído, através das análises de p-anisidina e TBA e seus *kits* equivalentes, respectivamente, AlkalSafe™ STD e AldeSafe™ STD.

Tabela 3. Amostras selecionadas para as determinações de p-anisidina e TBA e seus correlatos com os *kits* Diamed.

Amostra	Fritadeira	Data de coleta
A (controle)	1	26/01/2004
B	1	29/01/2004
C	1	09/02/2004
D	1	10/02/2004
E	1	13/02/2004
F	1	27/02/2004
G	1	01/03/2004
H	1	04/03/2004
I	1	17/03/2004
J	1	24/03/2004
K	1	25/03/2004
L	2	12/02/2004
M	2	13/02/2004
N	2	9/02/2004
O	3	18/02/2004
P	3	18/02/2004
Q	3	19/02/2004
R	3	04/03/2004
S	3	17/03/2004
T	3	29/03/2004

As amostras coletadas receberam tratamento com sulfato de sódio anidro na proporção de 2 g para cada 10 g de óleo, seguido de filtração em algodão. As amostras foram posteriormente acondicionadas em frascos âmbar com capacidade aproximada de 80 mL e congeladas a -18°C . No dia anterior às análises, as amostras foram descongeladas, sob refrigeração. Cerca de 20 minutos antes do início das análises, foram mantidas à temperatura ambiente e receberam um breve aquecimento a cerca de 50°C em chapa de aquecimento, de forma a homogeneizá-las.

2.1 Purificação dos reagentes para o teste de p-anisidina

Os reagentes de grau analítico utilizados para o teste de p-anisidina, isoctano e ácido acético, receberam tratamento especial, assim como os cristais de p-anisidina, de forma a purificá-los.

a) Isoctano

O isoctano foi tratado com ácido sulfúrico concentrado durante 1 dia, com agitação ocasional, trocando o ácido 4 vezes. Após este tratamento, adicionou-se solução aquosa de permanganato de potássio 0,1 N, deixando em contato por 24 horas. Separou-se a solução de permanganato com o auxílio de funil de separação e lavou-se com água destilada até obter pH neutro. Secou-se a solução, deixando-a em contato com sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada e destilada, segundo Swinehart (1969) e Fessenden, R. e Fessenden, J. (1983), desprezando-se cabeça e cauda. Manteve-se a solução em contato com sulfato de sódio anidro até o uso nas análises, quando foi filtrada (PERRIN, ARMAREGO, 1988).

b) Ácido acético

O ácido acético glacial foi tratado com permanganato de potássio, na proporção de 5 g para 1 L de ácido acético, deixando-o em contato por 24 horas. Em seguida, destilou-se (SWINEHART, 1969; FESSENDEN, R.; FESSENDEN, J., 1983), desprezando-se cabeça e cauda e foi mantido em contato com sulfato de sódio anidro até o uso, quando foi filtrado (PERRIN, ARMAREGO, 1988).

c) p-anisidina

Foram pesados 4 g de p-anisidina 99% (ALDR-A88255, lote 08212 LB, marca Aldrich) em *erlenmeyer* de 250 mL. Em capela, adicionou-se quantidade de água a aproximadamente 80°C suficiente para dissolver a anisidina. Utilizou-se bico de Bunsen para o aquecimento da solução filtrada, de forma que os vapores aquecessem constantemente o filtro, permitindo maior rendimento da filtração. Após a filtragem, esfriou-se imediatamente a solução em banho de gelo sob agitação e, em seguida, manteve-se a 0°C durante no mínimo 4 horas. Filtraram-se os cristais em papel de filtro em kitassato, com o auxílio de água para a sua transferência. O papel de filtro com os cristais purificados foi acondicionado em placa de Petri e levado ao dessecador a vácuo, operando à temperatura ambiente, protegido contra a luz, até a secagem completa (DGF, 1984). Após este procedimento, os cristais foram armazenados sob refrigeração em frasco de vidro âmbar sem a tampa, dentro de outra embalagem plástica secundária envolta com papel alumínio, contendo sílica ativada e azeólitas, de forma a garantir a ausência de umidade nos cristais.

2.2 Determinação de umidade por Karl Fischer

A determinação de umidade por Karl Fischer é adequada a amostras de óleos e lecitina com teor inferior a 5% de umidade (ORTHOEFER; SINRAM, 1996).

De forma a verificar o teor de umidade dos reagentes e das amostras, seguiu-se a metodologia da AOCS de determinação de umidade por Karl Fischer Ca 2e-84 (AOCS, 2004), em triplicata, com titulador *Titroline alpha* (Schott, Alemanha), bureta de 10 mL e agitador magnético TM 125 (Schott, Alemanha). O ponto final da titulação foi ajustado para 30 μ A, onde o equipamento automaticamente interrompe a transferência de titulante, sem interferência do operador, com agitação inicial de 30 segundos (AOCS, 2004). Foi utilizado reagente de Karl Fischer art. 9258, lote 1010308, da marca Merck (1 mL = min. 5 mg de água), contendo metoxietanol e isento de piridina em solução única.

Algumas pequenas modificações na metodologia foram necessárias, tendo em vista o volume do recipiente do titulador (“vaso”) e da bureta, as amostras utilizadas e as condições do teste.

a) Determinação do equivalente em água do reagente de Karl Fischer (Título)

Inicialmente, adicionaram-se 50 mL de clorofórmio pré-tratado com sulfato de sódio anidro e filtrado ao vaso reator e deu-se início à titulação automática com o Reagente de Karl Fischer para a desumidificação do meio de reação. A substituição do metanol por clorofórmio foi necessária, devido à observação de insolubilidade do óleo em metanol em ensaios prévios realizados. Este fato concorda com o que relataram Isengard e Kerwin (2003) para amostras de “butter oil”. Com o decorrer das determinações, a proporção requerida de solvente metanol:clorofórmio de 2:3 (HILDER, 1968) não é mantida ao longo dos experimentos, devido à presença de metanol na solução titulante de Karl Fisher. Sendo assim, o uso de apenas clorofórmio se torna uma alternativa eficaz.

Para a determinação do título, transferiram-se cerca de 20 mg (2 gotas) de água com o auxílio de seringa de 1 mL (Microstat Tuberculin, Estados Unidos) ao vaso reator contendo clorofórmio e, após 30 segundos de agitação, deu-se início à titulação automática com o reagente de Karl Fischer.

A razão entre a massa, em mg, e o volume gasto de titulante, em mL, é o valor do título.

b) Determinação de umidade presente nos reagentes e amostras

Das 73 amostras de óleo de fritura obtidas, foram escolhidas ao acaso 10 amostras para a determinação de umidade.

Para os reagentes analíticos e óleos de frituras, foram utilizadas massas equivalentes a 30 gotas, medidas em pipeta *Pasteur* com auxílio de bulbo de silicone. Para os cristais de p-anisidina, foram utilizados cerca de 200 mg nas determinações.

A porcentagem de água (% H₂O) presente na amostra é dada pela equação 1.

$$\% \text{ H}_2\text{O} = \frac{V * T}{m} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

onde: V = volume gasto na titulação;

T = Título em mg / mL; e

m = massa, em mg, de amostra.

2.3 Métodos oficiais

Primeiramente, foram realizadas as determinações pelos métodos oficiais da AOCS e ao dia seguinte, através do respectivo *kit*.

Para o teste de p-anisidina, adotou-se o método Cd 18-90 (AOCS,2004) e o reagente p-anisidina 99% de código A88255 da marca Aldrich (lote 08212 LB). Para o teste de TBA, o método utilizado foi Cd 19-90 (AOCS, 2004) e o ácido tiobarbitúrico de código 11496-000 da ACROS Organics (lote AO 18935701).

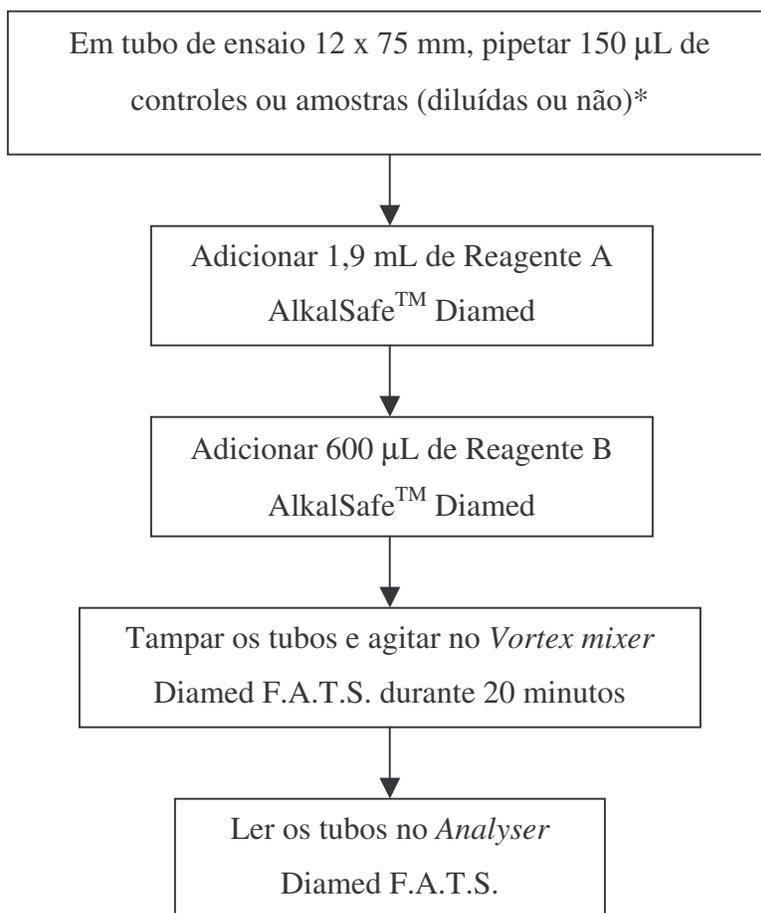
Para ambos os testes, as quantidades de amostras visaram valores de absorbância a 350 nm da solução final na faixa de 0,3 a 0,8 A, lidos em Espectrofômetro UV/VIS modelo Lambda 20 (Perkin Elmer, Alemanha).

Para o teste de p-anisidina, adotou-se 0,3 a 0,5 g de amostra, fez-se leitura de branco para cada amostra, e as leituras foram realizadas com as lâmpadas VIS + UV e cubetas de quartzo.

Já para o teste de TBA, as massas foram de 0,20 a 0,36 g, com as leituras na faixa do espectro visível.

2.4 Determinações de malonaldeído e alquenais com os *kits*

Os procedimentos para as análises com os *kits* estão esquematizado nas Figuras 2 e 3 e maior detalhamento pode ser obtido nos Apêndices D e E.



*os calibradores AlkalSafe não necessitam da adição de Reagentes A e B, necessitando apenas da transferência para tubos de ensaio, seguida de leitura.

Figura 2. Fluxograma do procedimento das análises com o *kit* AlkalSafe™ STD de quantificação de alquenais, segundo informações do fabricante.

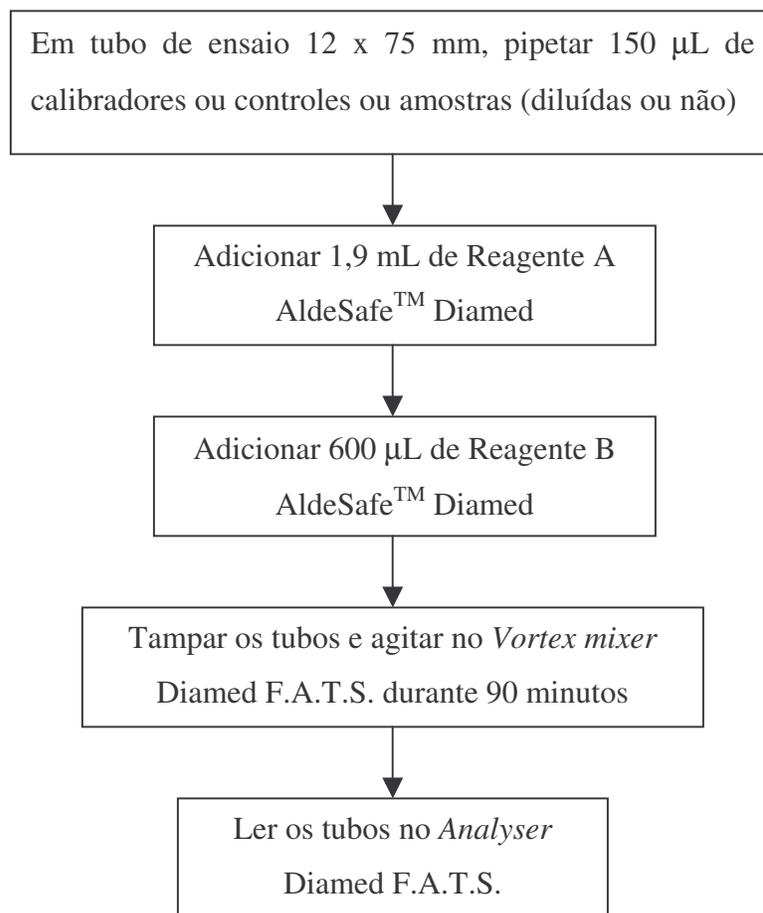


Figura 3. Fluxograma do procedimento das análises com o *kit* AldeSafe™ STD de quantificação de malonaldeído, segundo informações do fabricante.

2.5 Tratamento estatístico

Inicialmente, foram avaliados alguns parâmetros da estatística básica: média entre as repetições, desvio padrão, coeficiente de variação, diferença e pontos de máximo e de mínimo. Da comparação entre os métodos oficiais com os resultados obtidos com os *kits*, foram calculadas as razões entre os valores de p-anisidina e as concentrações de alquenais, em nmol/mL, e entre os números de TBA e as concentrações de malonaldeído, em nmol/mL.

Com o auxílio do programa *Minitab for Windows* versão 12.1 (MINITAB USER'S GUIDE, 1994; MINITAB REFERENCE GUIDE, 1994; RYAN JÚNIOR; JOINER; RYAN, 1976), foi feita a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (MONTGOMERY, 1991; COSTA NETO, 1992; MONTGOMERY; PECK, 1992), a fim de avaliar a existência ou não de correlação entre as metodologias. Para as metodologias que se correlacionaram com o respectivo *kit*, foi traçado o gráfico da correlação com as bandas de confiança e de predição 95% (MONTGOMERY; PECK, 1992; CHARNET et al., 1999).

Para comparar os teores de malonaldeído, alquenais, número de TBA e p-anisidina das amostras avaliadas, procedeu-se com a Análise de Variância, utilizando o *software SAS for Windows V 8* (COUNCIL, 1985). De forma similar, foi feita a comparação entre métodos através da ANOVA para o teste de p-anisidina e o *kit* AlkalSafe™ STD.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de umidade das amostras de óleo de fritura e dos reagentes analíticos

Os teores de umidade das dez amostras de óleos de fritura do RU estão relacionados na Tabela 4. Nota-se que houve variação de $0,101 \pm 0,013\%$ (amostra B) a $0,181 \pm 0,006\%$ (amostra G) e o tratamento prévio com sulfato de sódio anidro pouco interferiu nos valores de umidade, já que as duas amostras analisadas sem o tratamento estão compreendidas nessa faixa, sendo que uma delas está mais próxima ao limite inferior e a outra, ao limite superior.

Tabela 4. Teor de umidade por Karl Fischer de dez amostras de óleos de fritura.

Amostra	Fritadeira	Data de coleta	% umidade média	CV (%)
A (controle)	1	26/01	0,105 ± 0,002	1,7
B	1	27/01	0,101 ± 0,013 ¹	13,1
C	2	27/01	0,148 ± 0,021	14,2
D	1	29/01	0,164 ± 0,002	1,1
E	3	11/03	0,110 ± 0,006 ²	5,0
F	1	11/03	0,165 ± 0,016 ²	10,0
G	1	4/03	0,181 ± 0,006	3,2
H	2	19/02	0,146 ± 0,017	11,6
I	3	4/03	0,138 ± 0,010	7,2
J	4	19/02	0,119 ± 0,012	9,9

¹determinação em duplicata;

²amostras não sofreram tratamento com sulfato de sódio anidro

Em dois outros estudos, sem o tratamento prévio da amostra, os valores de umidade obtidos para óleos vegetais foram compatíveis ao obtidos no presente estudo. Hilder (1968) obteve teores de umidade na faixa de 0,074 a 0,285% para óleos de algodão, soja, coco, palma, misturas de óleo de palma com óleo de coco e banha. Em outro estudo, Silva (2005) obteve 0,169 ± 0,024%; 0,221 ± 0,015 % e 0,170 ± 0,007% para óleo de andiroba, de soja e de milho, respectivamente.

Os valores de umidade dos reagentes de grau analítico observados estão expressos na Tabela 5. O álcool butílico foi apropriado para o teste de TBA, com teor de umidade inferior a 0,5%, obedecendo ao estabelecido na metodologia oficial (AOCS, 2004).

Tabela 5. Umidade por Karl Fischer dos reagentes utilizados nos testes de TBA e p-anisidina.

Reagente	% umidade média	CV (%)
Ácido acético glacial purificado	$0,29 \pm 0,02$	6,0
Isoctano P.A. purificado	$0,05 \pm 0,01$	28,9
Cristais de p-anisidina	$1,2 \pm 0,1$	11,6
Álcool butílico P.A.	$0,28 \pm 0,04$	13,7

No entanto, à exceção do isoctano purificado, os demais reagentes utilizados no teste de p-anisidina apresentaram umidade elevada, superior ao valor requerido de 0,1%, de forma a interferir no teste.

O longo tempo (20,5 h a temperatura ambiente) de secagem dos cristais de p-anisidina em dessecador à vácuo não foi suficiente para atingir o padrão de umidade estabelecido pela metodologia oficial. Sob vácuo, a 40°C, o tempo de secagem recomendado é de 6 h (PERRIN, ARMAREGO, 1988), implicando que as condições adotadas deveriam ter sido suficientes para a secagem completa. Devido à higroscopicidade do reagente e à quantidade relativamente pequena requerida para o teste, supõe-se que o breve contato com a umidade do ambiente foi o responsável pela absorção de umidade.

Em relação à solução de ácido acético, tentou-se, sem sucesso, desumidificá-la com aproximadamente 0,3% de anidrido acético, conforme descrito por Morita e Assunção (2001). Diante desse fato, especulou-se que o teor de umidade obtido é inerente à solução de ácido acético.

3.2 Determinação de alquenais

3.2.1 p-Anisidina

O número de p-anisidina, ou índice de p-anisidina, foi de $8,5 \pm 1,5$ para a amostra controle, variando de $21,8 \pm 1,3$ a $64,3 \pm 3,7$ para as demais amostras de óleo utilizado nas frituras do período estudado (Apêndice I-1).

Na Tabela 6, estão relacionados os valores de p-anisidina de óleos de soja e palma.

Tabela 6. Valores de p-anisidina encontrados na literatura para óleos de soja e palma.

Tipo de amostra	p-anisidina	
Óleos de soja		
Convencional	$< 1^1$; $1,4^2$; $1,81^3$; $2,0^4$; $2,05 \pm 0,11^5$; de 0,53 a 4,83 (25 amostras mexicanas) ⁶ ; $6,3^7$	
Minimamente refinados, entre eles o óleo de soja alto oléico, sendo que algumas amostras estavam em contato com N ₂	0,14 a $0,25^8$	
Com baixo teor de ácido graxo linolênico	$1,52^9$	
Com baixo e muito baixo (“ultra low”) teor de linolênico	2,0 a $5,5^{10}$	
Óleos de palma		
Convencional	$1,51 \pm 0,10$ e $1,56 \pm 0,15^{11}$; $4,30 \pm 0,49^{12}$	
Oleína de Palma	$7,3^{13}$	
¹ NAZ et al., 2004; 2005	⁷ LIMA; GONÇALVES, 1994	¹² AL-KAHTANI, 1991
² CHU, 1991	⁸ WANG, X.; WANG, T.;	¹³ PLESSIS; MEREDITH, 1999
³ MAN et al., 1999	JOHNSON, 2003	
⁴ LIST et al., 1974	⁹ TOMPKINS; PERKINS, 2000	
⁵ TAN et al., 2002	¹⁰ SU; GUPTA; WHITE, 2003	
⁶ MEDINA-JUAREZ et al., 1988	¹¹ GIL; CHO; YOON, 2004	

É possível observar que os valores de p-anisidina relatados na literatura (Tabela 6) variaram de $< 1,0$ a $6,3$ para o óleo de soja convencional e de $1,5$ a $4,3$ para o óleo de

palma. Isto é, em geral, o valor de p-anisidina do óleo de soja é aproximadamente o mesmo que o valor para o óleo de palma, embora a composição em ácidos graxos seja distinta. Entre os ácidos graxos insaturados da palma, predomina o oléico, com porcentagem de 37,3 a 40,8% (SIEW et al., 1990 apud HUI, 1996), enquanto que há predominância do ácido linoléico no óleo de soja com 50,8% (PRYDE, 1980 apud HUI, 1996). O esperado seria valores mais elevados de p-anisidina para o óleo de soja, devido à maior susceptibilidade à oxidação, atribuída à sua composição em ácidos graxos.

No entanto, deve-se considerar a água como interferente no teste de p-anisidina (AOCS, 2004), o que explica a diversidade de valores encontrados na literatura, a maioria deles muito distantes do valor obtido no presente estudo, que foi numericamente superior a todos os valores reportados para amostras de óleo de soja. Daí, concluiu-se as tentativas de minimizar a interferência da umidade no teste podem não ter sido em vão, resultando nas melhores condições experimentais possíveis, embora não ideais, e conseqüentemente em um valor de p-anisidina mais próximo à realidade. Deve-se ressaltar que em nenhum outro estudo, os valores de umidade por Karl Fischer dos reagentes foram mencionados.

Os valores de p-anisidina obtidos em estudos oxidativos estão listados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de p-anisidina encontrados na literatura para estudos oxidativos de óleos de soja e palma.

Tipo de amostra	p-anisidina
Óleo de soja após 90 minutos de fritura de batatas por imersão a 180°C	inferior a 6 ¹
Óleos de soja armazenados a 60°C por 2 a 10 dias e expostos à presença de luz durante 2 a 16 horas	2,0 a 3,4 ²
Amostras de óleo de soja com baixo e muito baixo (“ultra low”) teor de linolênico submetidas a 2 a 12 meses a 21 e 32°C sob luz fluorescente	2,9 a 27,0 ³
Óleos de palma desodorizados estocados de 3 a 50 meses a temperaturas de 10 e 23°C	1,04 a 5,65 ⁴
Oleína de palma utilizada na fritura de batata a 168-180°C durante 2,0 a 30,5 horas	11,7 a 19,0 ⁵

¹NAZ et al., 2004; 2005

²LIST et al., 1974

³SU; GUPTA; WHITE, 2003

⁴IDRIS; ABDULLAH; HALIM, 1992

⁵PLESSIS; MEREDITH, 1999

Segundo os dados da literatura, a amostra controle do presente experimento apresentou valor de p-anisidina superior ao óleo de soja após 90 minutos de fritura a 180°C, a amostras estocadas a 60°C durante 2 a 10 dias e/ou expostas à luz (Tabela 7), o que é incoerente e evidencia a interferência da água no teste de p-anisidina.

Em relação a estudos de valores de p-anisidina para óleos de frituras, os resultados obtidos se assemelham a alguns estudos relatados na literatura.

Chy e Luo (1994) obtiveram valores de p-anisidina de 27,7 para o óleo de soja aquecido a 185-190°C durante 6 horas ao dia no período de 4 dias consecutivos, e de 34,9 a 59,5 para o óleo de fritura de produtos com composições diversas, variando o teor de água, açúcar e sal, nessas mesmas condições. Em outro estudo, nessas mesmas condições, obteve-se valor de p-anisidina de 93,3 para 40 horas de simulação de fritura (sem amostras) (CHU, 1991).

Aproximando o tempo de fritura do restaurante universitário para aproximadamente 4 horas por dia e desconsiderando as eventuais reposições de óleo e os períodos em que as fritadeiras não foram utilizadas, a amostra correspondente aos experimentos dos autores seria a H (Tabela 3), cujo valor foi de 43,4 (Tabela 6 do Apêndice I-1), o que concorda com a faixa de valores obtida pelos autores para produtos de naturezas diversas (Tabela 2). No entanto, os valores obtidos foram superiores aos de Lima e Gonçalves (1994), compreendendo valores de 6,3 a 25,8 para 0 a 44 horas de fritura e se equipararam às amostras de óleo de soja utilizado na fritura de batatas a 180°C durante 5 horas por dia, no período de 5 dias, cujos valores foram de 22,82 (1º dia) a 52,11 (MAN et al., 1999). Em outro estudo, ao utilizar óleo de soja com baixo teor de linolênico para frituras de “nuggets” de peixe e batatas, após 16 a 48 horas de fritura, os valores de p-anisidina foram, respectivamente de 63,3 a 67,6 e 41,4 a 56,3 (TOMPKINS; PERKINS, 2000).

Dana, Blumenthal e Sanguy (2003) constataram que os valores de p-anisidina de óleos de milho e canola, submetidos a ensaios simulando o processo de fritura, diminuíram ao longo do tempo na medida em que a água era injetada. Atribuíram esse fato ao efeito protetor das bolhas de água evaporadas, devido ao efeito da destilação que reduz a concentração de oxigênio dissolvido e elimina compostos voláteis da oxidação e possivelmente radicais livres gerados durante a fritura. É de se especular se as quantidades

remanescentes de água no óleo não seriam as responsáveis pelos menores valores de p-anisidina, já que a água possui um efeito inibitório no teste (AOCS, 2004).

3.2.2 *kit* AlkalSafe™ STD

Nos três testes com o controle AlkalSafe™ STD, o valor obtido foi bastante inferior à faixa esperada de 14 a 18 nmol/mL (Apêndice I-1). O mesmo resultado foi observado no Capítulo 6, com as análises com o mesmo *kit*, e até mesmo com os mesmos reagentes do *kit*, para as amostras de ração. O fato pode ser explicado pela inexistência de relação entre os calibradores utilizados para a construção da curva de calibração e os reagentes utilizados no teste (incluindo o reagente de cor). Este *kit* é o único do DiaMed F.A.T.S. cujos calibradores são soluções prontas e independentes.

Apesar do ocorrido, foram determinadas as concentrações de alquenais das amostras de óleo de fritura, visando a correlação de metodologias. As concentrações variaram de 12,9 a 670,8 nmol/mL (Apêndice I-1).

3.2.3 Análise do modelo

O *kit* AlkalSafe™ STD se correlacionou com o teste de p-anisidina Cd 18b-90, de acordo com a Figura 4. A equação que representa o modelo é $y = 9,07 x + 80,94$, com $r = 0,74$, explicando 55% da variação das concentrações de alquenais.

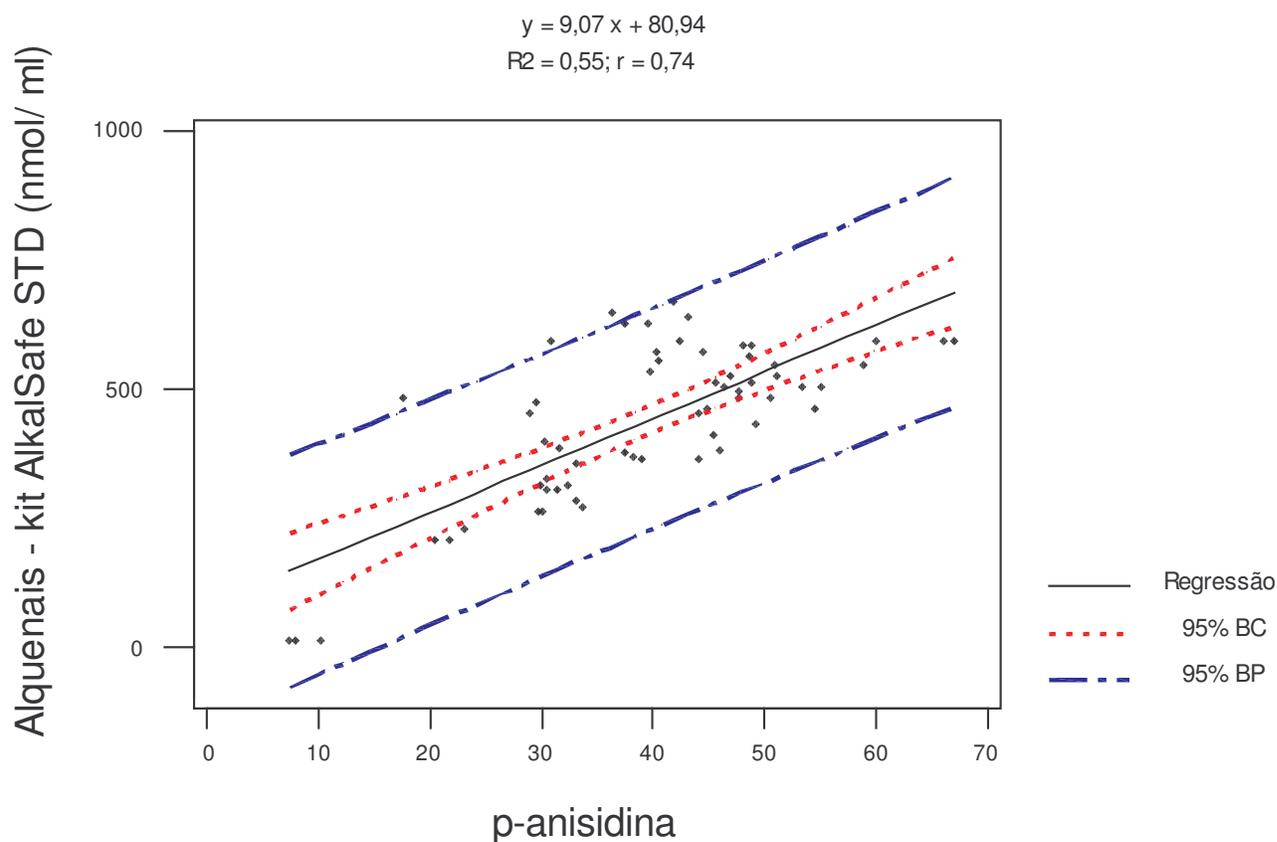


Figura 4. Gráfico da correlação entre as concentrações de alquenais, obtidas através do *kit* AlkalSafe™ STD, e valor de p-anisidina (AOCS Cd 18-90) para amostras de óleo de fritura, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

O modelo de regressão linear, segundo os resultados da Tabela 8, foi validado, com F significativo ($F_{\text{Calc}} > F_{\text{Tab}}$).

Tabela 8. Teste de ANOVA para a regressão linear - *kit* AlkalSafe™ STD, óleos de fritura.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F_{calc}	F_{Tab}	p
Regressão	791385	1	791385	70,43	$\cong 4,00$ ($\alpha = 5\%$)	0,000
Erro Residual	651692	58	11236			
Total	1443077	59				

3.2.4 Comparação entre médias para uma mesma metodologia

Aplicando a ANOVA para verificar se as amostras diferem estatisticamente quanto ao número de p-anisidina, seguida do Teste de Tukey, chegou-se aos valores da Tabela 9. Houve diferença significativa entre elas ao nível de 5% de significância, sendo que amostras com a mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 9. Números de p-anisidina médios, em ordem decrescente, obtidas pelo método oficial para amostras de óleo de fritura.

Amostra	p-anisidina
I	64,3 ^a
T	54,9 ^{ab}
Q	52,2 ^{bc}
K	48,6 ^{bcd}
P	47,9 ^{bcd}
S	47,7 ^{bcd}
N	46,1 ^{b^{cd}}
H	43,4 ^{cd}
F	43,2 ^{cd}
L	40,2 ^{de}
G	39,9 ^{de}
O	39,9 ^{de}
J	38,5 ^{de}
C	31,6 ^{ef}
M	31,6 ^{ef}
E	31,1 ^{ef}
D	30,9 ^{ef}
R	25,4 ^f
B	21,8 ^f
A	8,5 ^g

Analogamente à comparação de médias para os valores de p-anisidina, as amostras foram diferentes ao nível de 5% de significância, quanto às concentrações de alquenais. A Tabela 10 apresenta os resultados do Teste de Tukey, onde amostras de mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 10. Concentrações médias de alquenais, em nmol/mL, em ordem decrescente, obtidas pelo *kit* AlkalSafe STDTM para amostras de óleo de fritura

Amostra	Conc. de alquenais (nmol/mL)
J	649,2 ^a
I	595,4 ^{ab}
H	588,6 ^{ab}
G	584,6 ^b
O	572,3 ^{bc}
P	558,7 ^{bc}
T	520,2 ^{cd}
S	514,4 ^{cde}
Q	480,3 ^{def}
K	473,2 ^{def}
R	453,4 ^{ef}
N	442,6 ^{fg}
F	387,3 ^{gh}
M	366,1 ^{hi}
L	356,9 ^{hij}
D	319,1 ^{ijk}
C	297,5 ^{jk}
E	265,2 ^{k^l}
B	215,0 ^l
A	14,2 ^m

Comparando os resultados do Teste de Tukey para p-anisidina e o *kit* AlkalSafeTM STD (Tabelas 9 e 10), verifica-se que o *kit* foi mais sensível, na medida em que detectou maior número de grupos de amostras diferentes entre si.

3.3 Malonaldeído

As concentrações de malonaldeído presentes nas amostras de óleo de fritura foram de -2,12 a 38,45 nmol/mL (*kit* AldeSafe™ STD) e o número de TBA, de 0,013 a 0,047 (Apêndice I-2). Os valores negativos das concentrações de malonaldeído através do *kit* se deram porque o valor de absorbância do calibrador 1, referente à concentração zero, foi inferior ao da água desmineralizada (Tabelas 1 e 3 do Apêndice I-2).

O teste de TBA foi utilizado no monitoramento da oxidação de óleos vegetais submetidos ao aquecimento/fritura em alguns estudos (POKORNY; VALENTOVÁ; DAVÍDEK, 1985; OKIY; OKE, 1986; KISHIDA; ORIBE; KOJO, 1990; ABOU-GHARBIA et al., 1997; LAKE; SCHOLE, 1997; LIANG, 1999; CHU et al., 2001). Entretanto, não é possível comparar os valores de TBA obtidos experimentalmente com os dados da literatura, já que as metodologias utilizadas não foram as mesmas e o teste é altamente empírico, sendo possível obter diferentes valores, dependendo das condições do teste e da metodologia adotada. Na verdade, pode-se considerar este teste como uma metodologia alternativa para o acompanhamento da oxidação secundária, se esta apresentar boa correlação com os métodos tradicionais conhecidos. No entanto, ambas não necessitam apresentar números absolutos iguais (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2004).

3.3.1 Análise do modelo

Não houve correlação entre o *kit* AldeSafe™ STD e o teste de TBA. Conforme a Figura 5, apenas 6% da variação das concentrações de malonaldeído são explicadas pelo modelo ($r = 0,25$).

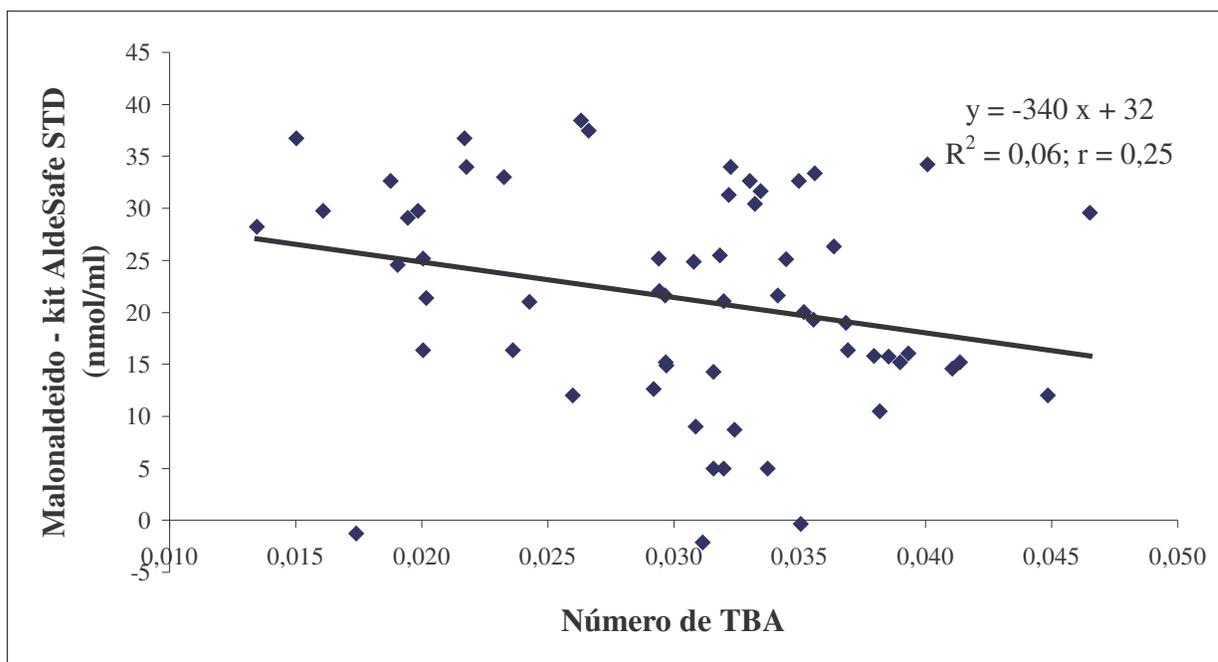


Figura 5. Gráfico da correlação entre as concentrações de malonaldeído, obtidas através do *kit AldeSafe*TM STD e TBA (AOCS Cd 19-90) para amostras de óleo de fritura.

Como se pode observar no teste de ANOVA, o modelo de regressão linear não foi válido (Tabela 12).

Tabela 11. Teste de ANOVA para a regressão linear - *kit AldeSafe*TM STD, óleos de fritura.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{calc}	F _{Tab}	p
Regressão	403,6	1	403,6	3,95	≅ 4,00 (α = 5%)	0,052
Erro Residual	5925,1	58	102,1			
Total	6328,8	59				

A ausência de correlação entre os métodos pode ser atribuído à pequena variação nos valores de TBA. Nos estudos de List e colaboradores (1974) e Chui, Antonoff e Olivieri (2002), o mesmo raciocínio pôde ser aplicado. Os primeiros não conseguiram correlacionar os valores de p-anisidina e as notas sensoriais para o atributo sabor. Os últimos não obtiveram correlação entre os parâmetros r e/ou R com os valores de umidade por Karl Fischer em amostras de óleo. A explicação para ambos foi a pequena amplitude dos valores dos atributos.

3.3.2 Comparação entre médias para uma mesma metodologia

Ao empregar o *kit* AldeSafeTM STD para a determinação de malonaldeído para as amostras de óleo de fritura, houve diferença significativa entre elas ao nível de 5% de significância. O mesmo pode ser dito para o teste de TBA. Os resultados do Teste de Tukey estão expressos nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 12. Concentrações médias de malonaldeído, em nmol/mL, em ordem decrescente, obtidas pelo kit AldeSafe STDTM para amostras de óleo de fritura.

Amostra	Conc. malonaldeído (nmol/mL)
S	37,3 ^a
J	35,2 ^{ab}
P	32,7 ^{bc}
O	32,6 ^{bc}
I	31,1 ^{cd}
N	29,5 ^{cd}
T	28,3 ^{de}
G	25,6 ^e
F	24,9 ^{ef}
M	21,5 ^{fg}
K	21,4 ^{fg}
Q	19,4 ^{gh}
D	16,4 ^{hi}
E	15,7 ^{ij}
L	15,2 ^{ij}
C	14,8 ^{ij}
H	12,2 ^{jk}
B	9,4 ^k
R	5,0 ^l
A	-1,2 ^m

Tabela 13. Números de TBA médios, em ordem decrescente, obtidos pelo método oficial para amostras de óleo de fritura.

Amostra	TBA
L	0,040 ^a
E	0,039 ^{ab}
I	0,038 ^{ab}
Q	0,036 ^{abc}
B	0,034 ^{abc}
H	0,033 ^{abc}
J	0,033 ^{abc}
G	0,032 ^{abc}
R	0,032 ^{abc}
K	0,032 ^{abc}
P	0,030 ^{abc}
C	0,030 ^{abc}
A	0,028 ^{abc}
T	0,027 ^{abc}
D	0,027 ^{abc}
M	0,025 ^{abc}
O	0,024 ^{abc}
F	0,023 ^{abc}
S	0,021 ^{bc}
N	0,018 ^c

Nota-se que o *kit* foi visivelmente mais sensível do que o teste de TBA, diferenciando maior número de amostras. Isto porque, embora os valores de TBA detectados sejam muito pequenos e inferiores à unidade, eles podem estar mais associados ao calor empregado no teste, acelerando o processo oxidativo e resultando num valor mais elevado de TBA (KAKUDA; STANLEY; VOORT, 1981) do que a concentração de malonaldeído presente nas amostras. Prova disso é que a amostra controle, que estava menos oxidada que as demais por não ter sido submetida ao aquecimento, não diferiu estatisticamente das últimas amostras coletadas (T e S, entre outras).

4 CONCLUSÕES

O teste de TBA não foi adequado na avaliação dos óleos de fritura do RU, provavelmente pelo fato do teste ser mais sensível a ácidos graxos poliinsaturados contendo três ou mais duplas ligações, não sendo adequado para a determinação de produtos da oxidação de lipídios contendo principalmente os ácidos graxos oléico e linoléico (JANEIRO, 1990 apud FRANKEL, 1993; GRAY, 1978), este último o caso do óleo de soja. As determinações de TBA são mais amplamente aplicadas a amostras biológicas, ao passo que as determinações de hexanal e p-anisidina são os métodos preferencialmente usados para a detecção de oxidação em óleos e gorduras (DOBARGANES; VELASCO, 2002).

Os valores de p-anisidina, de fato, permitiram visualizar as diferenças entre as amostras, mesmo com a interferência da água presente nas amostras e reagentes.

Considerando que na Arábia Saudita, os óleos de palma descartados dos restaurantes apresentaram valores de p-anisidina de 16,8 a 147,6 (AL-KAHTANI, 1991), os óleos de fritura do Restaurante Universitário, com valores entre $8,5 \pm 1,5$ e $64,3 \pm 3,7$, estavam em boas condições de uso no período de 26/01 a 29/03/2004.

Quanto ao emprego dos *kits* AldeSafe™ STD e AlkalSafe™ STD, o segundo se correlacionou satisfatoriamente com o teste de p-anisidina ($r = 0,74$). Já o primeiro não se correlacionou com o teste de TBA, pois as amostras apresentaram valores de TBA muito próximos entre si. No entanto, ambos os *kits* foram mais sensíveis do que os métodos convencionais.

A fim de correlacionar o *kit* de determinação de malonaldeído com o teste de TBA, é recomendável a escolha de outro tipo de amostra, como por exemplo, carnes, pescados e derivados. Osawa, Felício e Gonçalves (2004) concluíram que o teste de TBA fornece bons resultados no monitoramento da oxidação lipídica desses tipos de produtos. Além disso, outros autores empregaram satisfatoriamente o teste em carne de frango mecanicamente desossados, embutido fermentado tipo salame e hambúrguer tipo calabresa (POLLONIO, 1994; NASSU, 1999; ARISSETO, 2003).

5 REFERÊNCIAS

ABOU-GHARBIA, H. A. et al. Effects of processing on oxidative stability of sesame oil extracted from intact and dehulled seeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 3, p. 215-221, 1997.

ADDIS, P. B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 24, n. 10/11, p. 1021-1030, 1986.

AL-KAHTANI, H. Survey of quality of used frying oils from restaurants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, n. 11, p. 857-862, 1991.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 2004.

ARISSETO, A. P. **Avaliação da qualidade global do hambúrguer tipo calabresa com reduzidos teores de nitrito**. 2003. 131 p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2. ed. Berlin: Springer, 1999. cap. 3.

BERGER, K. G. The practice of frying. **PORIM Technology**, n. 9, 1984. 30 p.

CHARNET, R. et al. **Análise de modelos de regressão linear**. Campinas: Editora da Unicamp, 1999. 356 p.

CHU, B. S. et al. Performance of a lipase-catalyzed transesterified palm kernel olein and palm stearin blend in frying banana chips. **Food chemistry**, v. 74, p. 21-33, 2001.

CHU, Y.-H. A comparative study of analytical methods for evaluation of soybean oil quality. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, n. 6, p. 379-384, jun. 1991.

CHUI, Q. S. H.; ANTONOFF, H. B.; OLIVIERI, J. S. Utilização de índices r e R obtidos de programas interlaboratoriais para o controle de precisão de método analítico: determinação de água por Karl Fischer. **Química nova**, v. 25, n. 4, p. 657-659, 2002.

CHY, Y.-H.; LUO, S. Effects of sugar, salt and water on soybean oil quality during deep-frying. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 8, p. 897-900, 1994.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. 12. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1992. 264 p.

COUNCIL, K. A. Analysis of variance. In: HELWIG, J. T. (Ed.). **SAS Introductory guide**. 3 ed. Cary: SAS Institute Inc., 1985. p. 55-60.

CRAPISTE, G. H.; BREVEDAN, M. I. V.; CARELLI, A. A. Oxidation of sunflower oil during storage. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 12, p. 1437-1443, 1999.

DANA, D.; BLUMENTHAL, M. M.; SANGUY, I. S. The protective role of water injection on oil quality in deep fat frying conditions. **European Food Research Technology**, v. 217, p. 104-109, 2003.

DGF. **Deutsche einheitsmethoden zur untersuchung von fetten, fettprodukten und verwandten stoffen**. Stuttgart: Münster, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1984.

DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J. Analysis of lipid hydroperoxides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, p. 420-428, 2002.

FESSENDEN, R. J.; FESSENDEN, J. S. **Techniques and experiments for organic chemistry**. Boston: Willard Grant, 1983. 449 p.

FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, p. 220-225, jul. 1993.

GIL, B.; CHO, Y. J.; YOON, S. H. Rapid determination of polar compounds in frying fats and oils using image analysis. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 37, p. 657-661, 2004.

GONÇALVES, J. O sabor que vem de fora. **Revista Distribuição**. Disponível em: <www.revistadistribuicao.com.br/content.asp?page=196>. Acesso em: 05 nov. 2004. 01h40min.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, p. 539-546, jun. 1978.

HAMILTON, R. J.; ROSELL, J. B (Ed.). **Analysis of oils and fats**. London: Elsevier, 1986, 441 p.

HILDER, M. H. The solubility of water in edible oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 703-707, 1968.

HOUHOULA, D. P.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C. A kinetic study of oil deterioration during frying and a comparison with heating. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 2, p. 133-137, 2002.

HUI, Y. H. (Ed.). **Bailey's industrial oil and fat products**. New York: John Wiley, 1996. 708 p. v. 2.

IDRIS, N. A.; ABDULLAH, A.; HALIM, A. H. Evaluation of palm oil quality: correlating sensory with chemical analyses. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 3, p. 272-275, 1992.

INOUE, T.; ANDO, K.; KIKUGAWA, K. Specific determination of malonaldehyde by n-methyl-2-phenylindole or thiobarbituric acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 5, p. 597-600, 1998.

ISENGARD, H.-D.; KERWIN, H. Proposal of a new reference method for determining water content in butter oil. **Food Chemistry**, v. 82, p. 117-119, 2003.

JANEIRO, D. R. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990 apud FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, p. 220-225, jul. 1993.

KAKUDA, Y.; STANLEY, D. W.; VOORT, F. R. Determination of TBA number by high performance liquid chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 58, p. 773-775, jul. 1981.

KISHIDA, E.; ORIBE, M.; KOJO, S. Relationship among malondialdehyde, TBA-reactive substances, and tocopherols in the oxidation of rapeseed oil. **Journal of Nutrition and Science of Vitaminology**, v. 36, p. 619-623, 1990.

LAKE, R. J.; SCHOLLES, P. Quality and consumption of oxidized lipids from deep-frying fats and oils in New Zealand. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 9, p. 1065-1068, 1997.

LAWSON, H. W. **Standards for fats & oils**. Connecticut: AVI, 1985. 235 p., v. 5.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. A. G. Parâmetros de avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura. **Química Nova**, v.17, n. 5, 1994.

LIANG, J.-H. Fluorescence due to interactions of oxidizing soybean oil and soy proteins. **Food Chemistry**, v. 66, p. 103-108, 1999.

LIST, G. R. et al. Oxidation and quality of soybean oil: a preliminary study of the anisidine test. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 51, p. 18-21, fev. 1974.

MAN, Y. B. C. et al. Quality changes of refined-bleached-deodorized (RBD) palm olein, soybean oil and their blends during deep-fat frying. **Journal of Food Lipids**, v. 6, p. 181-193, 1999.

MEDINA-JUAREZ, L. A. et al. Effects of processing on the oxidative stability of soybean oil produced in México. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 12, p. 1729-1733, 1998.

MINITAB USER'S GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. 285 p.

MINITAB REFERENCE GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. v. 1.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3 ed. Singapore: John Wiley, 1991. 649 p.

_____.; PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis**. 2 ed. New York: John Wiley, 1992, 527 p.

MORITA, T.; ASSUNÇÃO, R. M.; **Manual de soluções, reagentes & solventes: padronização, preparação, purificação**. 11. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 629 p.

NASSU, R. T. **Utilização de carne de caprinos no processamento de embutido fermentado, tipo salame**. 1999. 131 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NAZ, S. et al. Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. **Food Research International**, v. 38, n. 2, p. 127-134, 2005.

_____. Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. **Food Chemistry**, v. 88, p. 253-259, 2004.

OKIY, D. A.; OKE, O. L. Some chemical changes in heated crude palm oil. **Food Chemistry**, v. 21, p. 161-166, 1986.

OLIVEIRA, P. de. Cenário atual do setor de refeição coletiva. Desenvolvido pela Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas. Disponível em: <<http://www.aberc.com.br>>. Acesso em: 05 nov. 2004. 01h09min.

ORTHOEFER, F. T.; SINRAM, R. Oil processing and quality assurance. In: HUI, Y. H. (Ed.). **Bailey's industrial oil & fat products**. 5. ed. New York: John Wiley, 1996. Cap. 7, p. 391-410.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E. de; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes, pescados e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**. Artigo aprovado para publicação em 8 nov. 2004.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**. 3. ed. São Paulo: Pergamon, 1988. 391 p.

PLESSIS, L. M du; MEREDITH, A. J. Palm olein quality parameter changes during industrial production of potato chips. **Journal of the American Oils Chemists' Society**, v. 76, n. 6, p. 731-738, 1999.

POKORNY, J.; VALENTOVÁ, H.; DAVÍDEK, J. Modified determination of 2-thiobarbituric acid value in fats and oils. **Die Nahrung**, v. 29, n. 1, p. 31-38, 1985.

POLLONIO, M. A. R. **Estudo das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares e oxidação lipídica de carne de frango mecanicamente desossada**. 1994. 159 f. Tese

(Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PRIDE, E. H. In: ERICKSON, D. R. et al. (Ed.). **Handbook of soy oil processing and utilization**. St. Louis: American Soybean Association e Champaign: American Oil Chemists' Society, 1980. cap. 2 apud HUI, Y. H. (Ed.). **Bailey's industrial oil and fat products**. New York: John Wiley, 1996. v. 2.

PRZYBYLSKI, R.; ESKIN, N. A. M. Measurement and significance of volatile compounds. In: WARNER, K.; ESKIN, N. A. M. (Ed.). **Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods**. Champaign: AOCS, 1995, p. 107-133 apud TOMPKINS, C.; PERKINS, E. G. The evaluation of frying oils with the p-anisidine value. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 8, p. 945-947, 1999.

RYAN JÚNIOR, T. A.; JOINER, B. L.; RYAN, B. F. **Minitab student handbook**. Massachusetts: Duxbury, 1976. 337 p.

SAFETY ASSOCIATES. Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John Sorensen, John F. Elias, Virginia C. Gordon. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. CA n. PI 2267226, 30 set. 1997, 09 abr. 1998.

_____. John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi, Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 4197235, 27 fev. 2004, 07 out. 2004.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. AU n. PI 759265, 21 out. 1998, 29 abr. 1999.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 3064423, 26 mar. 2003, 03 abr. 2003.

_____. Virginia C. Gordon, John Sorensen, Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. US n. PI 6489132, 02 set. 1999, 03 dez. 2002.

SILVA, C. L. M da. **Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol**. 2005. Tese (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005. Trabalho em andamento.

SIU, W. L. et al. **Porim rep. PO**, v. 172, 1990 apud HUI, Y. H. (Ed.). **Bailey's industrial oil and fat products**. New York: John Wiley, 1996. v. 2.

SU, C.; GUPTA, M.; WHITE, P. Oxidative and flavor stabilities of soybean oils with low- and ultra-low-linolenic acid composition. **Journal of the American Oils Chemists' Society**, v. 80, n. 2, p. 171-176, 2003.

SWINEHART, J. S. **Organic chemistry**: an experimental approach. New York: Meredith, 1969. 599 p.

TAN, C. P. et al. Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. **Food Chemistry**, v. 76, p. 385-389, 2002.

TOMPKINS, C.; PERKINS, E. G. The evaluation of frying oils with the p-anisidine value. **Journal of the American Oils Chemists' Society**, v. 76, n. 8, p. 945-947, 1999.

_____.; _____. Frying performance of low-linolenic acid soybean oil. **Journal of the American Oils Chemists' Society**, v. 77, n. 3, p. 223-229, 2000.

WANG, X.; WANG, T.; JOHNSON, L. A. Chemical and sensory properties of gas-purged minimum-refined, extruded-expeller soybean oil. **Journal of the American Oils Chemists' Society**, v. 80, n. 9, p. 923-926, 2003.

WHITE, P. J. Conjugated diene, anisidine value, and carbonyl value analyses. In: WARNER, K.; ESKIN, N. A. M. (Ed.). **Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods**. Champaign: AOCS, 1995. cap. 9.

YOSHIDA, H. Composition and quality characteristics of sesame seed (*Sesamum indicum*) oil roasted at different temperatures in an electric oven. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 65, p. 331-336, 1994.

6 AGRADECIMENTOS

À DiaMed AG (Suíça) pelo financiamento da pesquisa e fornecimento dos kits e ao Sr. José Togashi, responsável pelo Restaurante Universitário, pela concessão das amostras.

CAPÍTULO 6 - Avaliação da qualidade de “pet foods” através de *kits* rápidos e métodos oficiais⁵

RESUMO

O mercado de rações para animais domésticos no Brasil está num estado de rápida expansão, crescendo em média de 20% ao ano durante a década de 90, com aumento acumulado de mais de 400% durante o período de 1994 a 2001. Além disso, o potencial de crescimento é elevado, já que apenas 40% dos animais domésticos são alimentados com produtos industrializados. A natureza altamente competitiva do mercado significa que a qualidade do produto final, especialmente a presença de rancidez resultante da oxidação lipídica, pode ter um impacto crítico nas vendas e deve ser monitorada. O presente trabalho objetivou a avaliação do estado oxidativo de 18 amostras de ração utilizando os *kits* DiaMed F.A.T.S. e os métodos oficiais da AOCS de determinação de ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido e concentração de malonaldeído e alquenal no lipídio extraído por hidrólise ácida. Os resultados foram submetidos à Análise de Regressão Linear e ANOVA. Houve elevada correlação entre os resultados obtidos com o *kit* de AGL e os do método oficial ($r = 0,88$), embora se necessite de fator de correção de 1,25 para estabelecer equivalência. As amostras de rações avaliadas estavam pouco oxidadas, e dessa forma, não foram adequadas para as análises relacionadas à oxidação. Necessitam-se de outros estudos com amostras em um estado oxidativo mais avançado. Constatou-se que os *kits* DiaMed F.A.T.S. são análises de baixo custo para a avaliação da oxidação e podem viabilizar estudos de vida de prateleira, mesmo quando o teor lipídico é bastante baixo.

Palavras-chaves: rações, oxidação lipídica, correlação, métodos AOCS, Diamed F.A.T.S

⁵Artigo de acordo com as normas de publicação da Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ABSTRACT

The market for pet foods in Brazil is in a state of rapid growth, increasing as an average of 20% per year during the 1990's, with an accumulated increase of more than 400% during the period from 1994 to 2001. Moreover, the potential for further increases is high, since only 40% of all pets are fed with industrialized products. The highly competitive nature of the market means that the quality of the final product, especially the presence of rancidity resulting from lipid oxidation, can have a critical impact on sales and should be monitored. The present paper was designed to evaluate the oxidative state of 18 pet food samples using both Diamed F.A.T.S. *kits* and official AOCS methods for determination of free fatty acids (FFA), peroxide value and the concentration of malonaldehyde and alkenal in lipid extracted by acid hydrolysis. The results were subjected to Linear Regression Analysis and ANOVA tests. The results obtained with the FFA *kit* were found to correlate highly with those obtained using the official method ($r = 0.88$), although a correction factor of 1.25 was necessary to establish equivalence. The pet food samples analyzed evidenced little oxidation, and thus did not provide an adequate samples for the analysis of characteristics related to oxidation. Further studies investigating samples in a more advanced stage of oxidation should be conducted. The DiaMed F.A.T.S. *kits* were found to provide an inexpensive analysis for the evaluation of oxidation and can make shelf-life studies feasible, even when the level of lipids is quite low.

Keywords: pet foods, lipid oxidation, correlation, AOCS methods, Diamed F.A.T.S.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está no segundo lugar entre os países com a maior população de animais de estimação, atrás apenas dos Estados Unidos, dentro de um universo que não pára de crescer (LIMA, 2004). Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais (ANFAL), o mercado de “Pet Food” brasileiro possui um potencial de mais de 3,2 milhões de toneladas, a fim de atender um universo de 38 milhões de animais de estimação, entre 27 milhões de cães e 11 milhões de gatos (ALIMENTOS PARA BICHOS DE ESTIMAÇÃO, 2002). Na década de 1990, estimou-se um aumento de 41% no número de cães e gatos no Brasil (MESQUITA, 2004). O fato dos animais domésticos serem considerados praticamente membros da família movimentou um respeitável mercado que vai da indústria (rações, vacinas), passando pelo varejo (“pet shops”) e chegando aos serviços (hotéis, “dogwalkers” e veterinários). Apenas o segmento de rações é responsável por 80% da movimentação do setor e ainda tem muito potencial de crescimento (PAGEL, 2004). Segundo o economista Celso Grisi, professor da Faculdade de Economia e Administração da Universidade de São Paulo, “o mundo dos animais domésticos deixou de ser uma simples mania, para se transformar num mercado com forte potencial de crescimento e muito importante para a economia brasileira” (LIMA, 2004).

A indústria brasileira de alimentação animal é a terceira em âmbito mundial, perdendo apenas para os Estados Unidos e a China e exporta para mais de 40 países. No período de 1994 a 2001, o consumo de ração no Brasil aumentou mais de 400%, passando de 220 mil toneladas para 1,17 milhão de toneladas em 2001 (RAÇÃO PARA PEQUENOS ANIMAIS EM ALTA, 2002), com crescimento médio de 20% ao ano na década de 1990. Em 2003, o Brasil comercializou 1,295 milhões de toneladas de “pet food” com U\$ 1,2 bilhões de faturamento. A projeção para 2004 é de 1.375.298 toneladas, com faturamento previsto de U\$ 1.301.948.700,00 e crescimento de 7% em termos de volume. O potencial de crescimento da produção brasileira de “pet food” é elevado, tendo em vista que as estatísticas de 2003 apontam para a alimentação de 40% de animais domésticos com alimentos industrializados, isto é, 60% dos animais estão sendo alimentados com sobras de mesa.

Além disso, o número de exportações de rações em geral também tende a crescer. Em 2003, o Brasil exportou 24 mil toneladas, com um faturamento de US\$ 13 milhões. Calcula-se para 2004, 34 mil toneladas exportadas e faturamento de US\$ 16 milhões, equivalente a apenas 2,47% da produção nacional ou 4,25% do volume de exportação americana (CUTAIT, 2004). Outros fatores, como ampla disponibilidade de matérias-primas de boa qualidade, tecnologia e produtos comparados ao do mercado internacional, 50% da capacidade de produção ociosa e preços extremamente competitivos internamente e externamente, são favoráveis ao aumento na produção de rações (CUTAIT, 2004).

Quanto à diversidade de produtos existentes no mercado, as rações são segmentadas de acordo com a faixa-etária (júnior, adulto jovem e adulto sênior) e conforme o porte do animal (mini, médio e grande), sendo que algumas levam em conta as peculiaridades de cada raça (MESQUITA, 2004).

As 68 empresas nacionais fabricantes de ração empregam 70 000 pessoas (LIMA, 2004). De acordo com especialistas do ramo, o principal investimento das empresas de "pet food" é a qualidade final dos produtos (RAÇÃO PARA PEQUENOS ANIMAIS EM ALTA, 2002).

Os óleos e gorduras de constituição são os responsáveis pela principal alteração organoléptica ocorrida nas rações ao longo de sua vida útil, a oxidação lipídica, mais comumente conhecida como rancidez. Tendo isto em vista, é necessário o monitoramento dos produtos por meio de testes como de ácidos graxos livres (%AGL), índice de peróxidos, p-anisidina e TBA. Como muitos dos fabricantes de rações provavelmente não possuem laboratórios equipados para a execução das análises convencionais, é conveniente o emprego de metodologias rápidas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade de amostras de ração para animais domésticos, através da determinação de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, número de TBA e p-anisidina por métodos oficiais da AOCS e com os *kits* correlatos DiaMed F.A.T.S. (SAFETY ASSOCIATES, 1998; 1999; 2002; 2003; 2004).

1.1 Ácidos Graxos Livres

A porcentagem de ácidos graxos livres (%AGL) é a porcentagem em peso de um ácido graxo específico (por exemplo, o ácido oléico), enquanto que a acidez é definida como a massa, em mg, de KOH necessária para neutralizar os ácidos livres presentes em 1 g de óleo ou gordura (NIELSEN, 1998). É o resultado da oxidação hidrolítica de lipídios (PIÑOL; BORONAT, 1989).

1.2 Índice de Peróxidos

Peróxidos são os principais produtos iniciais da oxidação de lipídios e podem ser medidos através de técnicas fundamentadas na habilidade de liberar iodo a partir de iodeto de potássio (iodometria) (AOCS, 2004), na oxidação de ferro a íons férrico (SAFETY ASSOCIATES, 1998; 1999; 2002; 2003; 2004), ou, ainda, através de reações enzimáticas, métodos físicos ou técnicas cromatográficas (DOBARGANES; VELASCO, 2002).

1.3 Teste de TBA

O número de TBA é calculado como miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra e baseia-se na reação de cor entre o TBA e os produtos de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, medidos espectrofotometricamente (HAMILTON; RUSSELL; AOCS, 2004).

1.4 p-anisidina

Os peróxidos no óleo oxidado, de origem animal ou vegetal, são intermediários transitórios que se decompõem em vários compostos carbonílicos e outros compostos, principalmente 2,4-dienais e 2-alquenais, na presença de anisidina em meio ácido.

O número de anisidina é definido como 100 vezes a densidade óptica medida a 350 nm em uma cubeta de 1 cm de solução contendo 1,00 g de óleo em 100 mL de mistura de solvente e reagente (AOCS, 2004).

1.5 Kits Diamed F.A.T.S. para matrizes complexas

Com os mesmos princípios de análises dos *kits* classificados como padrão (STD) e de alta sensibilidade (HSY), os *kits* destinados a matrizes complexas (MSA) avaliam a qualidade de carnes, rações em geral, peixes, alimentos e órgãos frescos, requerendo a extração dos lipídios antes das análises. O solvente utilizado é o isopropanol e pode-se observar na Figura 1 o sistema de filtração por membranas.

Dependendo da amplitude de detecção requerida para a análise, os *kits* MSA podem ser substituídos pelos *kits* STD, uma vez que este possui faixa de detecção da ordem de nmol/mL, enquanto que aquele detecta níveis da ordem de $\mu\text{mol/mL}$ e ambos podem ser utilizados para alimentos em que o óleo e/ou gordura não são os únicos constituintes.

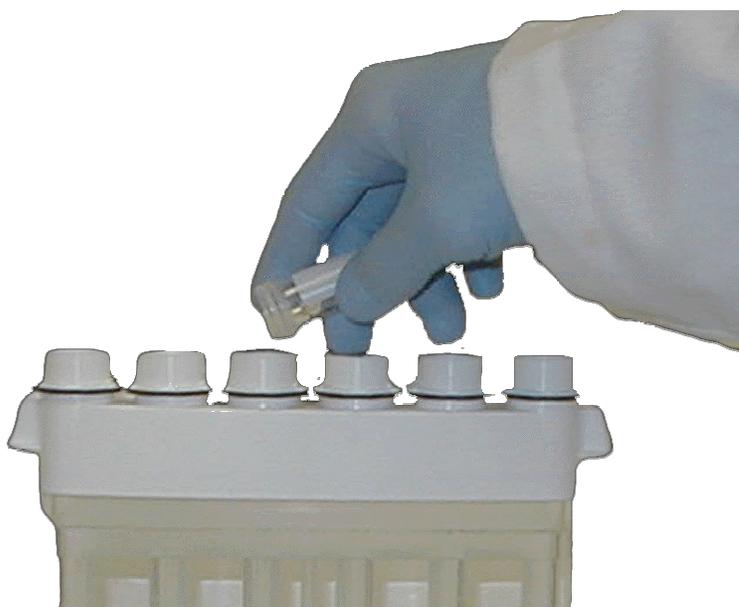


Figura 1. Sistema de filtração por membranas DiaMed F.A.T.S.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram fornecidas cerca de 200 a 400 g de amostras de ração por empresa do ramo, num total de 18 amostras de 6 tipos de produtos, em diferentes estágios de oxidação.

Os prazos de validade das amostras se encontravam vencidos nas datas de análises de todas as determinações realizadas.

2.1 Extração do óleo e/ou gordura das rações

A extração do óleo e/ou gordura das amostras de ração foi feita a frio, com as amostras finamente trituradas, segundo procedimento descrito por Gutkoski (1997) e Soares Júnior (2000), com algumas modificações. A proporção adotada de amostra e éter de petróleo foi de 2:3 (m/v) - 100 g de amostra:150 mL de éter de petróleo em *erlenmeyer* com tampa - e o tempo de contato da amostra com o solvente foi de 90 minutos sob agitação, seguido de pernoite em repouso em local escuro, seco e fresco. Após este procedimento, as amostras foram transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para béquer de 250 mL e adicionou-se sulfato de sódio anidro na proporção de 2 g para 10 de óleo + solvente. Filtrou-se, então, com papel de filtro em balão volumétrico de 250 mL e procedeu-se a recuperação do solvente em rotaevaporador em banho de água a 40°C.

O óleo e/ou gordura extraída, cerca de 7 gramas, foi transferida para frasco de vidro âmbar com o auxílio de pipeta *Pasteur* e bulbo de silicone.

As amostras foram mantidas a -18°C até o dia das análises, quando foram imersas, uma de cada vez, em banho de água a 50°C para o descongelamento e a expulsão do solvente residual com a injeção de nitrogênio líquido.

2.2 Métodos oficiais

Foram utilizadas as seguintes metodologias:

- a) **Ácidos graxos livres:** em triplicata, segundo o método Ca 5a-40 (AOCS, 2004), com modificações: utilizando 30 mL de álcool etílico 95% (adicionando-se 5% de água ao álcool etílico absoluto), 0,2 g de amostra e solução titulante de NaOH 0,05 N, padronizada com padrão primário (MORITA; ASSUNÇÃO, 2001).
- b) **Índice de peróxidos:** no Capítulo 4, utilizando menor quantidade de amostra e solução mais diluída de tiosulfato de sódio, foi possível correlacionar os *kits* PeroxySafe™ STD e HSY com o método oficial Cd 8b-90 (AOCS, 2004). Procedimento similar foi feito aqui: para as amostras de rações, pesou-se 0,2 g de amostra em *erlenmeyer* de 100 mL com tampa. Dissolveu-se a amostra com 25 mL solução de ácido acético:isooctano 3:2. Adicionou-se 0,5 mL de solução de KI saturado, tampou-se o *erlenmeyer* e deixou reagir durante 1 minuto, com agitação eventual. Em seguida, foram adicionados 15 mL de água destilada e procedeu-se com a titulação, utilizando solução de tiosulfato de potássio 0,001 N, padronizada com dicromato de potássio (MORITA; ASSUNÇÃO, 2001), e solução de amido 1% recém preparada como indicador.
- c) **Número de TBA:** segundo o método Cd 19-90 (AOCS, 2004), utilizando 0,15 a 0,25 g de amostra, a fim de que os valores de absorvância do teste estivessem na faixa de 0,2 a 0,8 A, quando medidos a 530 nm em espectrofotômetro UV/VIS modelo Lambda 20 (Perkin Elmer, Alemanha). O álcool butílico utilizado (lote 040168, marca VETEC) estava adequado para o teste, com teor de umidade de $0,28 \pm 0,04\%$ (Capítulo 4). Utilizou-se ácido tiobarbitúrico 11496-000, lote AO 18935701, da marca ACROS Organics.
- d) **p-anisidina:** de acordo com o método Cd 18-90 (AOCS, 2004). O ácido acético glacial, isooctano de grau analítico e p-anisidina 99% (ALDR-A88255, lote 08212 LB, marca Aldrich) foram purificados conforme descrito no Capítulo 4, assim como apresentaram teores de umidade, respectivamente, de $0,29 \pm 0,02\%$; $0,05 \pm 0,01\%$ e $1,2 \pm 0,1\%$.

2.3 Kits

Os procedimentos de análises com os *kits* AciSafe™ MSA, PeroxySafe™ MSA, AldeSafe™ STD e AlkalSafe™ STD estão detalhados, respectivamente, nos Apêndices B-3, C-3, D e E.

2.4 Determinação do teor de lipídios

Como os *kits* para matrizes complexas expressam os resultados em relação à massa de amostra e as determinações pelo método oficial se deram a partir do lipídio extraído a frio, foi necessário determinar o teor de lipídios de cada amostra para se fazer a correlação entre as metodologias. As determinações foram realizadas em duplicata.

Antecedendo a extração dos lipídios das rações, produtos com alto índice de proteínas e açúcares, fez-se a digestão das amostras com ácido, em duplicata, de forma a converter os lipídios ligados na forma facilmente extraída. A hidrólise ácida é requerida para liberar os lipídios covalentemente ligados a proteínas e carboidratos (SHAHIDI, 1998).

Pesaram-se aproximadamente 2 g de amostra triturada em béquer de 250 mL. Secou-se o conjunto em estufa pré-aquecida a 105°C por 1 hora. Depois de seco, adicionaram-se 45 mL de água fervente, misturando bem com bagueta e, a seguir, adicionou-se 55 mL de solução HCl concentrado em água na proporção de 2:1 (v/v), misturou-se bem e cobriu-se com vidro relógio. Levou-se o béquer à chapa de aquecimento e deixou-se ferver até a completa digestão da amostra, indicada pela cor preta da solução e ausência de pontos brancos. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro e o béquer, a bagueta e o vidro relógio foram lavados com água destilada quente, adicionando a água da lavagem ao funil da filtração. Limpou-se todo o material utilizado com algodão, após a lavagem, e colocou-se o algodão utilizado no funil. Adicionou-se água quente ao funil até que o filtrado se encontrasse límpido. Após a filtração, abriu-se o papel de filtro sobre placa de Petri, com o auxílio de espátula e levou-se a estufa para secar a 105°C durante 1 hora. Após seco, o papel de filtro contendo amostra e algodão foram colocados em cartuchos apropriados para a extração de gordura (GURR, 1984; LESS, 1979).

Antes da extração de gordura, foram secos balões volumétricos de 250 mL em estufa a 105°C durante 1 hora, resfriados em dessecador e, a seguir, determinou-se o peso dos balões sem umidade.

Montou-se o extrator Soxhlet e utilizando mistura de éter de petróleo e éter etílico, foi feita a extração da gordura, sob refluxo por 6 horas.

O solvente foi recuperado em rotaevaporador e o balão foi seco na estufa a 105°C por 1 hora, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem.

O teor de gordura, em %, presente na amostra foi determinado pela equação 1.

$$\% \text{ gordura} = \frac{(A - B)}{C} * 100\% \quad (\text{equação 1})$$

onde: A = massa, em g, do balão volumétrico e do óleo extraído das amostras;

B = massa, em g, do balão volumétrico; e,

C = massa, em g, de amostra.

2.5 Tratamento estatístico

Inicialmente, foram avaliados alguns parâmetros da estatística básica: média entre as repetições, desvio padrão, coeficiente de variação, diferença relativa entre os métodos (para os *kits* AciSafeTM MSA e PeroxySafeTM), pontos de máximo e de mínimo. Já para os *kits* AldeSafeTM STD e AlkalSafeTM STD, cujas escalas não são as mesmas que suas respectivas metodologias oficiais, TBA e p-anisidina, para todos os valores, foram calculadas as razões entre o valor de p-anisidina e a concentração de alquenais, em nmol/kg ração, e entre a concentração de malonaldeído, em nmol/kg de ração, e o número de TBA.

Com o auxílio do programa *Minitab for Windows*, versão 12.1 (MINITAB USER'S GUIDE, 1994; MINITAB REFERENCE GUIDE, 1994; RYAN JÚNIOR; JOINER; RYAN, 1976), foi traçado o gráfico dos resultados obtidos com o *kit versus* os respectivos resultados gerados pelo método oficial para os quatro tipos de análises, tendo em vista a obtenção da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (MONTGOMERY, 1991; COSTA

NETO, 1992; MONTGOMERY; PECK, 1992), assim como as bandas de 95% de confiança e de 95% de predição (MONTGOMERY; PECK, 1992; CHARNET et al., 1999), a fim de avaliar a existência ou não de correlação entre as metodologias.

Foi feita, ainda, a Análise de Variância, utilizando o *software SAS for Windows V 8* (COUNCIL, 1985), comparando os métodos e/ou as amostras para a mesma metodologia empregada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de gordura das rações variou de $10,4 \pm 0,3$ a $24,9 \pm 1,8\%$ (Apêndice J-1).

3.1 Ácidos Graxos Livres

A Figura 2 ilustra os valores de %AGL obtidos pelos dois métodos para amostras de ração. A %AGL variou de 4,1 a 17,5% ácido oléico, em base lipídica, utilizando o *kit AciSafe™ MSA* e de 4,5 a 28,7% ácido oléico para o método da AOCS (Apêndice J-2).

A diferença entre os valores obtidos pelos dois métodos foi de -51,6 a 77,2%, como pode ser observado na Figura 3.

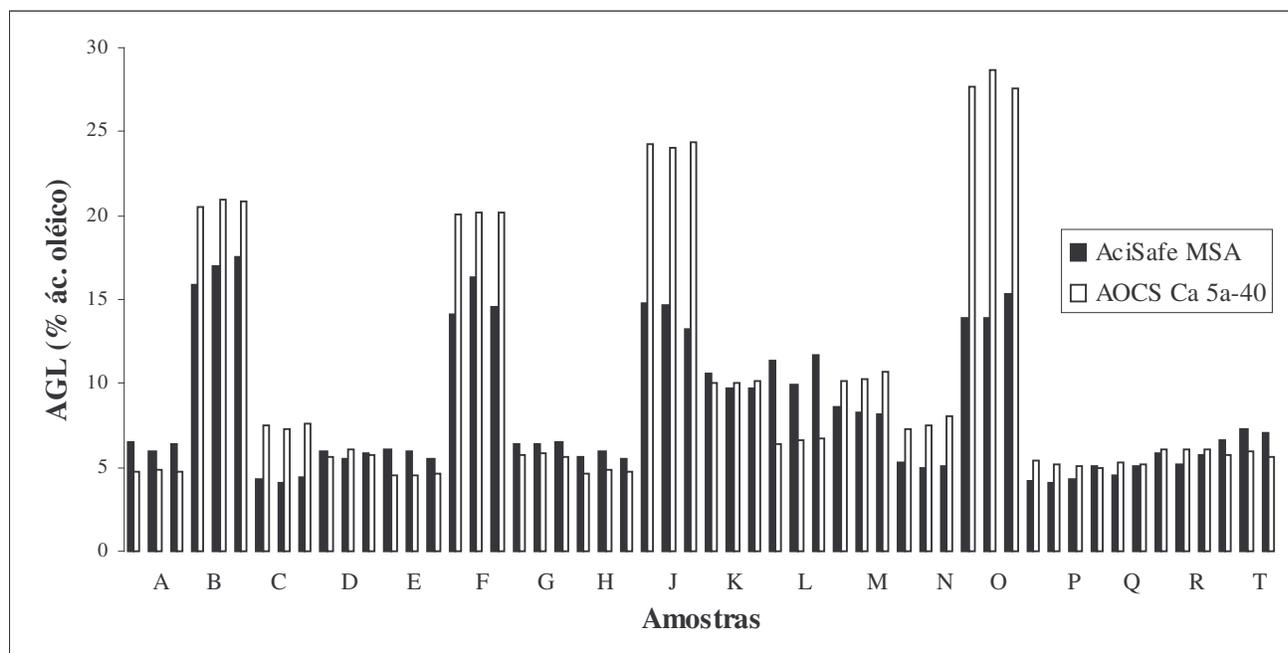


Figura 2. Gráfico ilustrativo dos valores de %AGL, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* AciSafe™ MSA e pela metodologia AOCS Ca 5a-40 modificada, em triplicata, para amostras de ração.

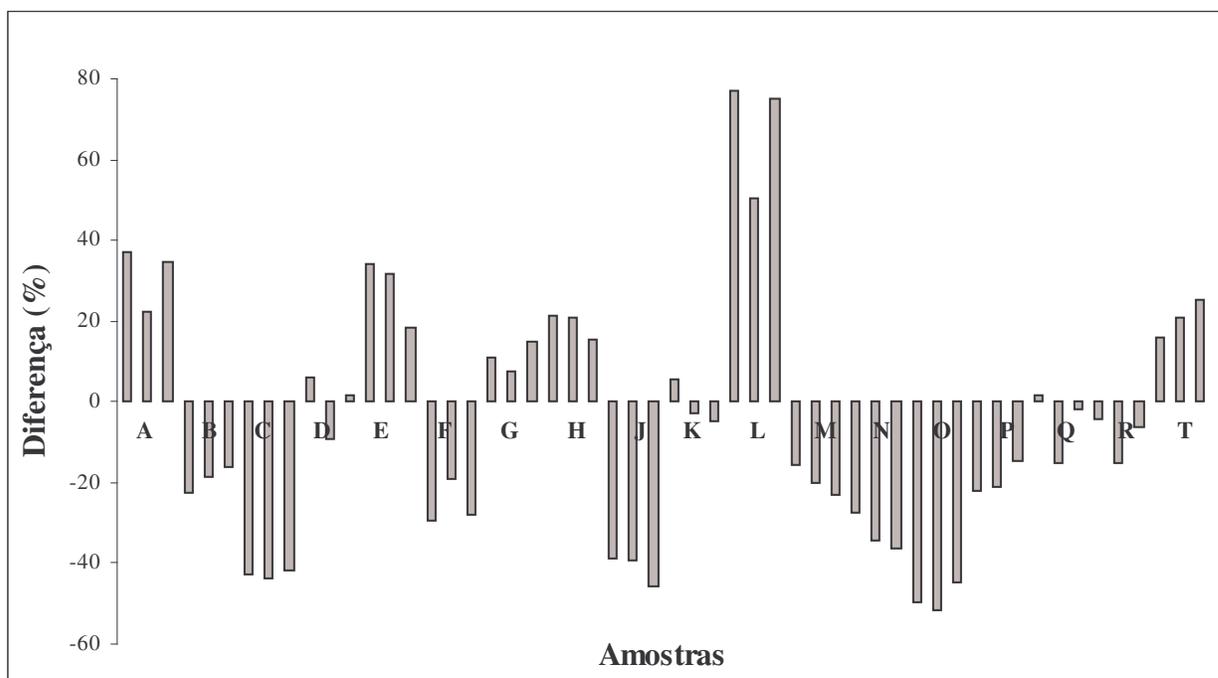


Figura 3. Diferença, em %, entre os valores de ácidos graxos livres obtidos pelo *kit* AciSafe™ MSA e pela metodologia AOCS Ca 5a-40 modificada, em triplicata, para amostras de ração.

3.1.1 Análise do modelo

De acordo com a Figura 4, a correlação do *kit* AciSafe™ MSA com o método modificado da AOCS foi positiva, representada pela equação $y = 0,49x + 3,44$ e coeficiente de correlação de 0,88, explicando 78% da variação dos resultados obtidos pelo *kit*.

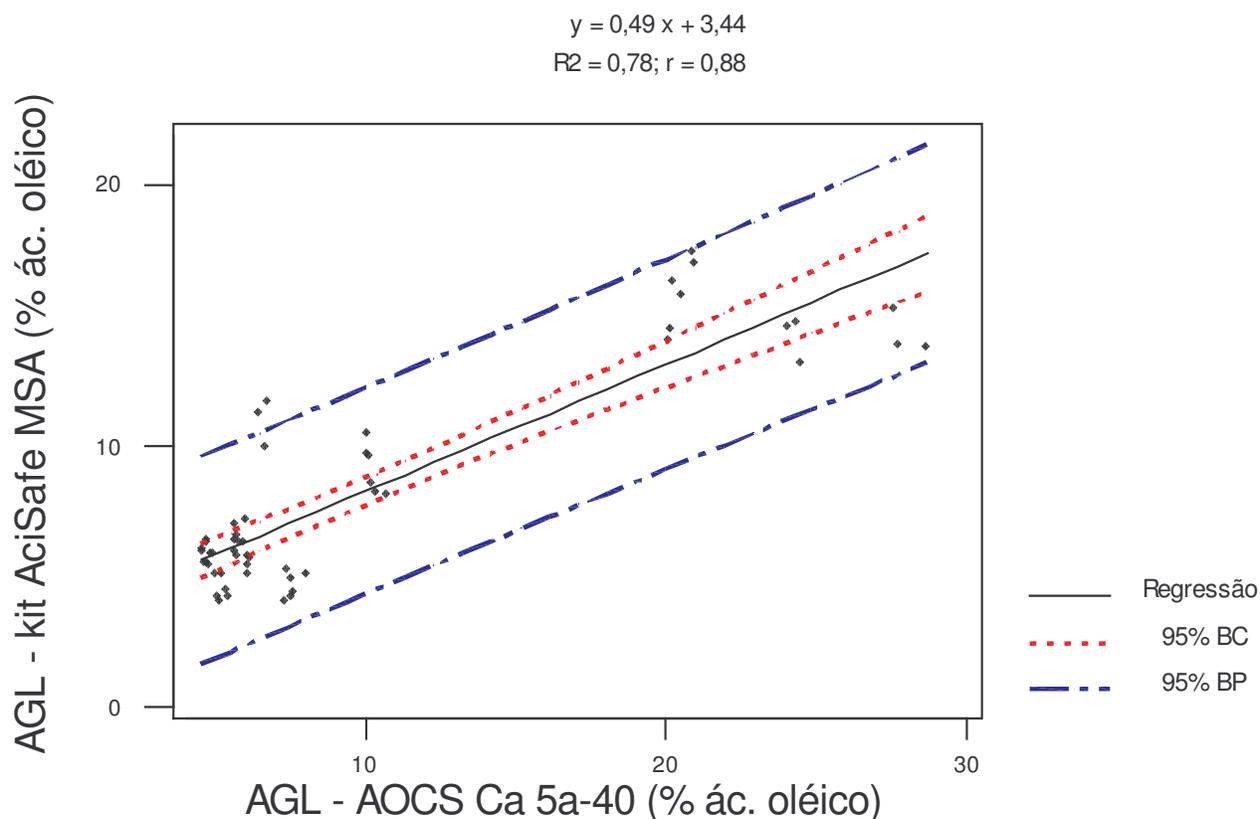


Figura 4. Gráfico da correlação entre os valores de %AGL de amostras de ração, em % ácido oléico, obtidos pelo *kit* AciSafe™ MSA e pela metodologia AOCS Ca 5a-40 modificada, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

A Tabela 1 indica que o modelo de regressão linear foi validado, com valor de F obtido altamente significativo ($F_{\text{calc}} > F_{\text{Tab}}$).

Tabela 1. ANOVA para a regressão linear - *kit* AciSafe™ MSA.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab}	p
Regressão	683,36	1	683,36	179,85	≈ 4,04 ($\alpha = 5\%$)	0,000
Erro Residual	197,58	52	3,80			
Total	880,94	53				

3.1.2 Comparação de médias

Comparando os valores de %AGL obtidos pelo *kit* AciSafe™ MSA com os resultados dados pelo método oficial modificado, através de ANOVA, houve diferença significativa ao nível de 1 e 5% de significância (Apêndice K). No entanto, ao dividir os valores obtidos pelo método oficial modificado pelos valores correspondentes obtidos pelo *kit*, as razões encontradas foram em média de $1,2 \pm 0,4$ (Tabela 9 do Apêndice J-2).

Sendo assim, os valores obtidos pelo *kit* foram corrigidos por um fator de correção inicial de 1,20 e procedeu-se a Análise de Variância com os resultados. Por tentativa e erro, chegou-se nos fatores de correção de 1,20 e 1,30 para que não houvesse diferença significativa ao nível de 1 e 5% de significância entre os valores obtidos por ambas as metodologias.

3.2 Índice de Peróxidos

O Índice de Peróxidos das amostras de ração foi de 0,4 a 3,0 meq/kg, em base lipídica, para o *kit* PeroxySafe™ MSA e 1,3 a 7,1 meq/kg para o método Cd 8b-90 modificado (Apêndice J-3). A distribuição dos valores de IP comparativamente para os dois métodos empregados está ilustrada na Figura 5.

As diferenças entre os valores de IP obtidos pelas duas metodologias foram de -86,5 a 48,9% (Figura 6 e Apêndice J-3).

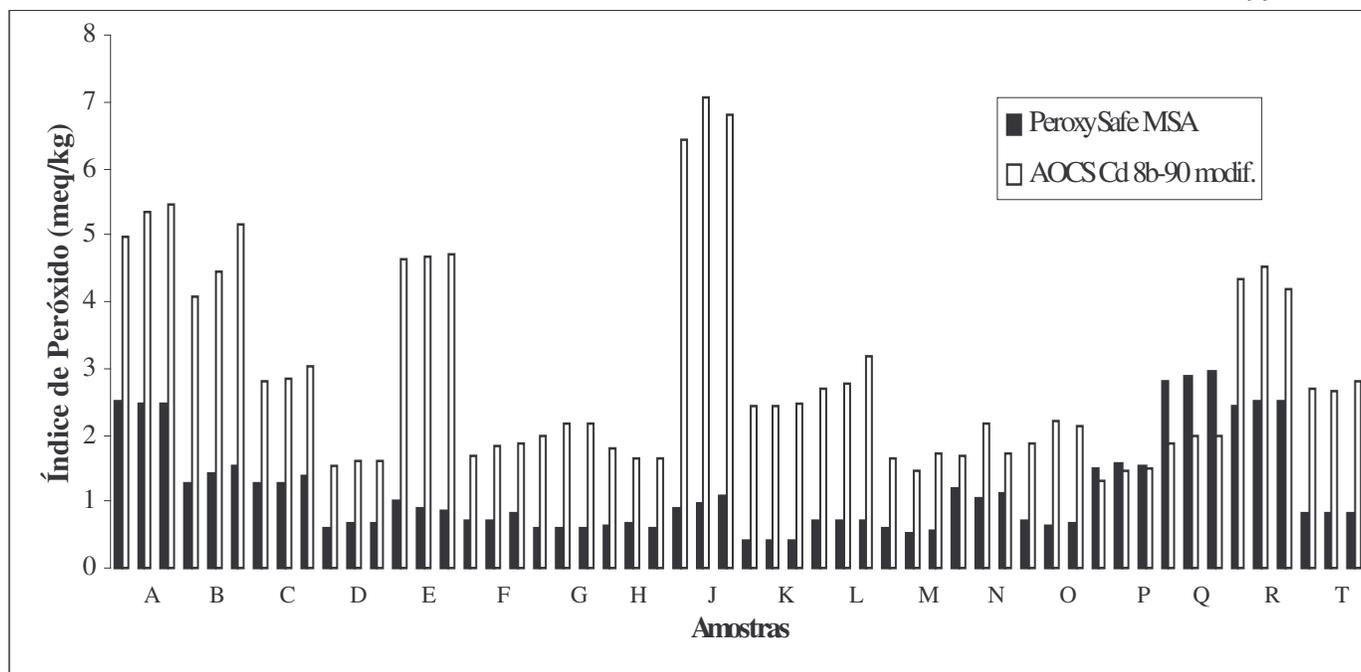


Figura 5. Gráfico ilustrativo dos valores de IP, em meq/kg, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ MSA e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 modificada, em triplicata, para amostras de ração.

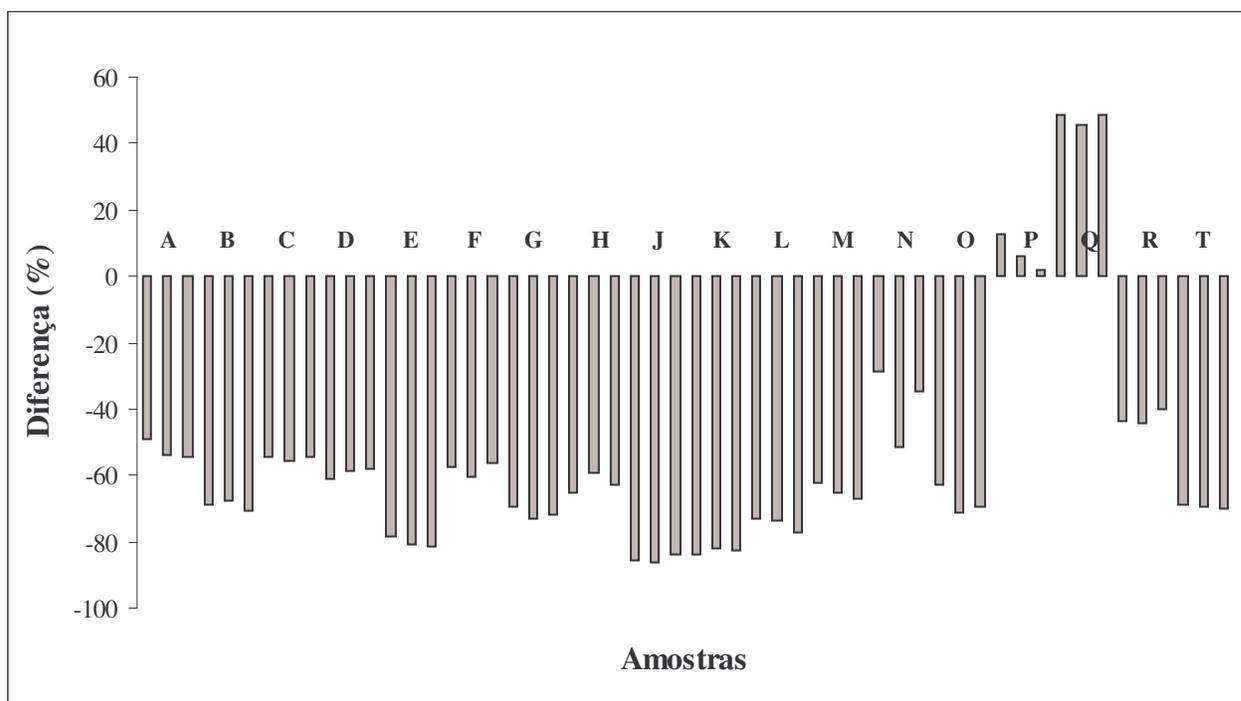


Figura 6. Diferença, em %, entre os valores de IP obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ MSA e pela metodologia AOCS Cd 8b-90 modificada, em triplicata, para amostras de ração.

3.2.1 Análise do modelo

Não houve correlação do *kit* PeroxySafe™ MSA com o método AOCS Cd 8b-90 modificado, tendo em vista que o valor de r foi 0,31, explicando apenas 10% da variação dos resultados obtidos pelo *kit* (Figura 7).

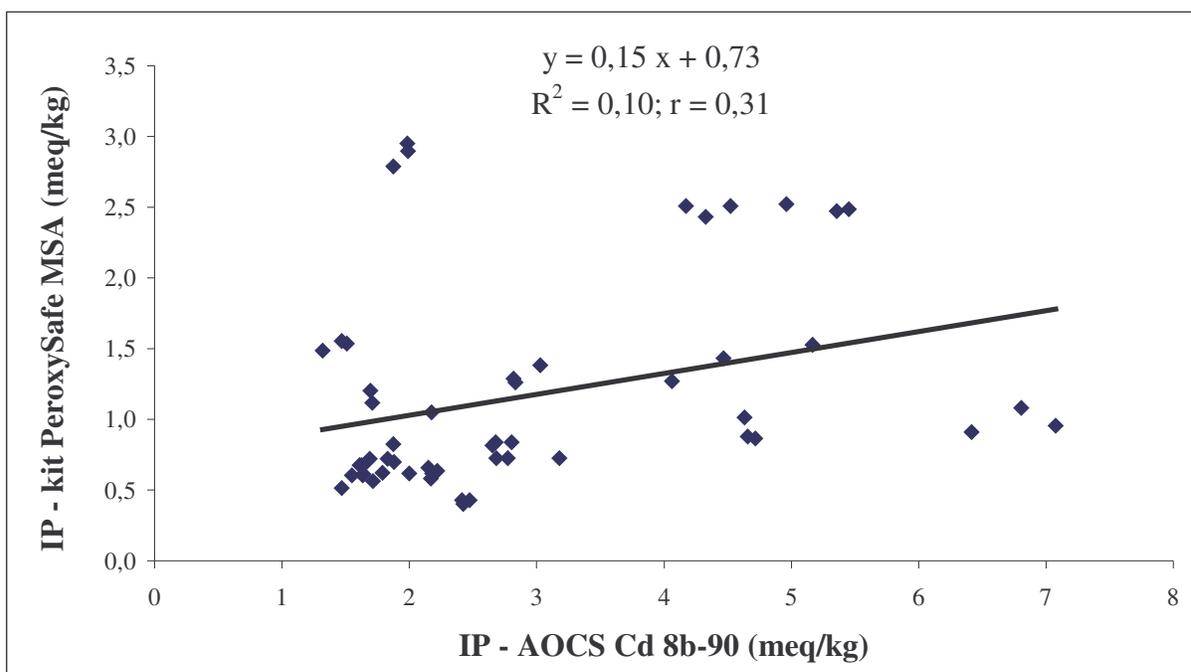


Figura 7. Gráfico da correlação entre os valores de IP de amostras de ração, em meq/kg, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ MSA e pela metodologia AOCS Cd 8b-90, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

Além disso, o teste de ANOVA comprovou que o modelo não foi válido. O valor de F_{calc} é aproximadamente o mesmo que o valor de F_{Tab} , sendo o modelo pouco significativo (Tabela 2).

Tabela 2. ANOVA para a regressão linear - *kit* PeroxySafe™ MSA.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab}	p
Regressão	2,69	1	2,69	5,60	≈ 4,04 ($\alpha = 5\%$)	0,022
Erro Residual	25,18	52	0,48			
Total	27,87	53				

Avaliando os valores de peróxidos obtidos (item 3.2), nota-se que os valores foram muito baixos. A ausência de correlação entre os métodos pode ser atribuída à pequena variação nos valores de peróxidos, sendo que a amplitude de valores foi de 0,8 meq/kg para o *kit* e de 5,8 meq/kg para o método oficial modificado.

3.2.2 Comparação de médias

Segundo os resultados da Tabela 3, houve diferença significativa entre os valores de índice de peróxidos, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ MSA e pelo método oficial modificado ao nível de 1 e 5% de significância.

Tabela 3. ANOVA para comparação de médias - *kit* PeroxySafe™ MSA.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	83,53	1	83,53	128,50	≅ 6,90 ($\alpha = 1\%$)	< 0,0001
Amostras	92,16	17	5,42		≅ 3,95 ($\alpha = 5\%$)	
Resíduo	57,90	89	0,65			
Total	233,59	107				

Como não houve correlação entre os métodos, não é possível corrigir os valores obtidos pelo *kit* com um fator de correção a ser determinado por tentativa e erro.

3.2.3 Comparação de médias para uma mesma metodologia

A fim de verificar se as amostras diferiram significativamente entre si para o mesmo método, foi feita a Análise de Variância e o teste de Tukey.

3.2.3.1 *Kit PeroxySafe*TM MSA

Para as determinações de IP através do *kit PeroxySafe*TM MSA, as amostras são diferentes entre si ao nível de 5% de significância.

A Tabela 4 apresenta os valores médios de índice de peróxidos das amostras, obtidos pelo *kit PeroxySafe* MSATM. Amostras de mesmas letras, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Tabela 4. Concentrações médias de peróxidos, em meq/kg, em ordem decrescente, obtidas pelo *kit PeroxySafe* MSATM para amostras de ração.

Amostra	Conc. de peróxidos (meq/kg)
Q	2,0 ^a
A	2,5 ^b
R	2,5 ^b
P	1,5 ^c
B	1,4 ^{cd}
C	1,3 ^d
N	1,1 ^e
J	1,0 ^{ef}
E	0,9 ^{fg}
S	0,8 ^{fgh}
F	0,8 ^{ghi}
L	0,7 ^{hij}
O	0,7 ^{hij}
D	0,7 ^{hij}

H	0,6 ^{ij}
G	0,6 ^{ij}
M	0,6 ^{jk}
K	0,4 ^k

3.2.3.2 Método oficial modificado

De forma análoga ao *kit PeroxySafe™ MSA*, houve diferença significativa, ao nível de 5% de significância, entre as amostras avaliadas pelo método oficial modificado de determinação de índice de peróxido. A Tabela 5 apresenta os resultados do teste de Tukey.

Tabela 5. Concentrações médias de peróxidos, em meq/kg, em ordem decrescente, obtidas pelo método oficial modificado para amostras de ração.

Amostra	Conc. de peróxidos (meq/kg)
J	6,8 ^a
A	5,3 ^b
E	4,7 ^{bc}
B	4,6 ^c
R	4,3 ^c
C	2,9 ^d
L	2,9 ^d
S	2,7 ^{de}
K	2,4 ^{def}
G	2,1 ^{def}
O	2,1 ^{def}
Q	1,9 ^{fgh}
N	1,9 ^{fgh}
F	1,8 ^{gh}
H	1,7 ^{gh}
M	1,6 ^{gh}
D	1,6 ^{gh}
P	1,4 ^h

Comparando os dois métodos, o *kit* PeroxySafe™ MSA detectou praticamente o mesmo número de grupos de amostras que o método oficial modificado (Tabelas 4 e 5). No entanto, as seqüências das amostras não foram equivalentes, até porque os valores de peróxidos apresentaram pequenas amplitudes para ambos os métodos.

Tudo indica que a modificação do método oficial não foi adequada. A viragem da titulação, além de subjetiva, foi difícil de ser visualizada. No Capítulo 4, concluiu-se que ao utilizar solução mais diluída de titulante, os valores obtidos se distanciaram dos valores obtidos pelo *kit*.

3.3 Concentração de alquenais e p-anisidina

As concentrações de alquenais obtidas através do *kit* AlkalSafe™ STD para amostras de ração variaram de 100,5 a 374,9 nmol/kg de gordura, enquanto que os valores de p-anisidina foram de -11,2 a 55,8 (Apêndice J-4).

Os valores negativos de p-anisidina, uma condição irreal, podem ser atribuídos à presença de água nas amostras e reagentes. Conforme determinado no Capítulo 5, o teor de umidade por Karl Fischer foi elevadíssimo para o reagente de p-anisidina, da ordem de 1%, muito superior ao limite de 0,1% estabelecido no método (AOCS, 2004). Sendo assim, valores mais baixos que os valores reais de p-anisidina foram obtidos, devido à interferência da água na reação do teste. Como as amostras estavam pouco oxidadas, foi possível obter valores negativos.

No caso do *kit*, deve-se ressaltar que as amostras M, N, P, Q, R e S estavam abaixo do limite de detecção do *kit* (Apêndice J-4), mesmo utilizando a menor diluição possível das amostras (2,5). Isto pode ter ocorrido pelo fato da curva de calibração ser construída com soluções já prontas, que independem dos reagentes utilizados no teste do controle e das amostras. Nos itens 3.1.1 e 3.2.1 do Apêndice J-4, pode-se observar que para as duas curvas de calibração construídas, as concentrações obtidas para o controle, respectivamente $3,3 \pm 0,3$ e $4,7 \pm 1,1$ nmol/kg, foram muito inferiores à faixa esperada de 14 a 18 nmol/kg.

3.3.1 Análise do modelo

O gráfico da correlação entre a concentração de alquenais, em nmol/kg de gordura e o valor de p-anisidina é dado pela Figura 8.

O coeficiente de correlação r foi de 0,28, explicando apenas 8% da variação dos valores obtidos pelo *kit*, de forma que não houve correlação entre as metodologias. Isto pode ter ocorrido porque as amostras estavam pouco oxidadas, havendo maior concentração dos valores de p-anisidina na região entre -15 e 15. Esta região está próxima aos valores encontrados na literatura para óleos refinados não oxidados (Capítulo 5).

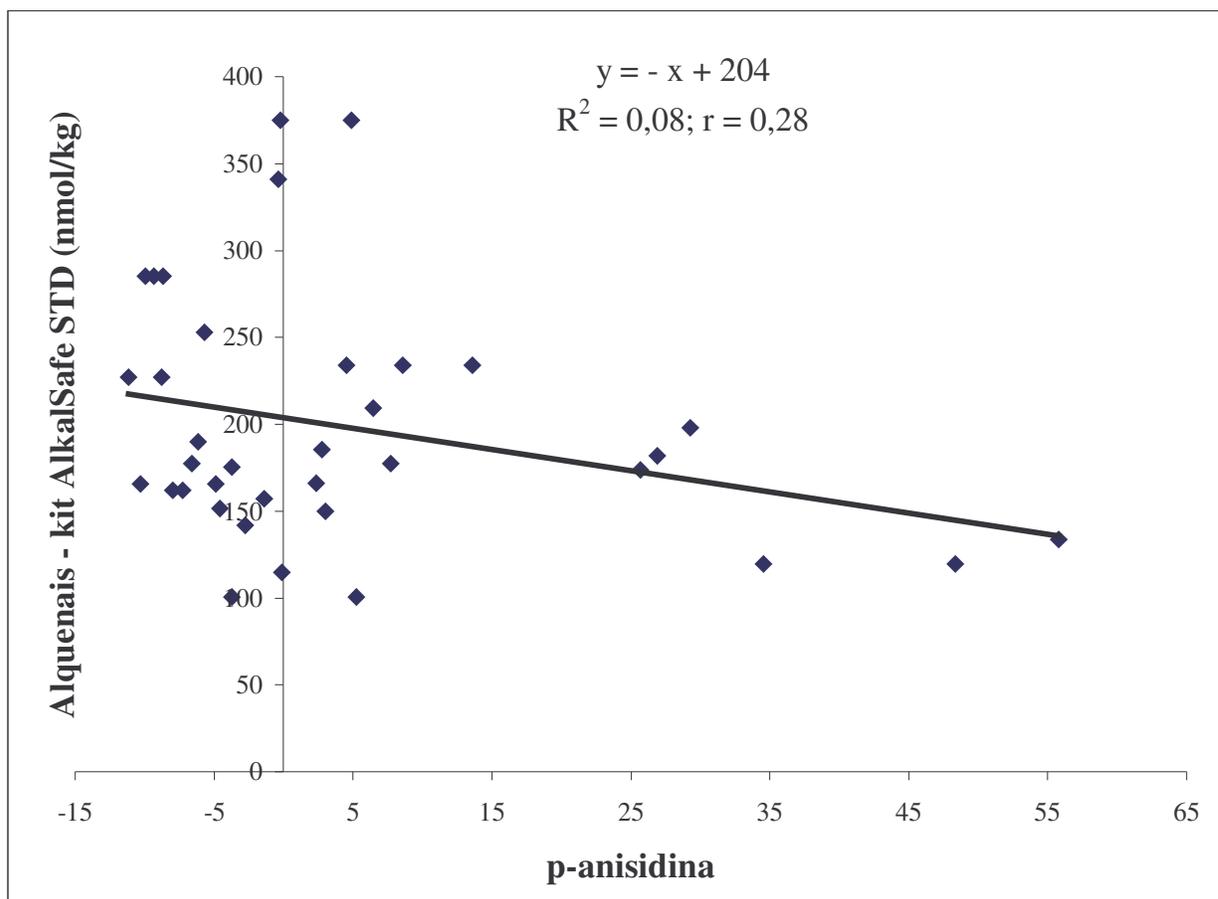


Figura 8. Gráfico da correlação entre a concentração de alquenais obtida pelo *kit* AlkalSafe™ STD, em nmol/kg de lipídio, e os valores de anisidina de amostras de ração, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

3.3.2 Comparação de médias para uma mesma metodologia

3.3.2.1 *Kit AlkalSafe™ STD*

Levando em consideração as concentrações de alquenais das amostras, houve diferença significativa entre elas ao nível de 5% de significância. Amostras com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância (Tabela 6).

Tabela 6. Concentrações médias de alquenais, em nmol/kg, em ordem decrescente, obtidas pelo *kit AlkalSafe STD™* para amostras de ração.

Amostra	Conc. de alquenais (Nmol/kg)
K	363,6 ^a
L	285,2 ^b
F	235,8 ^c
J	233,8 ^c
B	190,7 ^d
O	184,6 ^{de}
G	173,7 ^{de}
H	167,2 ^{de}
A	161,3 ^{de}
E	152,6 ^{ef}
D	124,4 ^{fg}
C	105,2 ^g

Apesar das 6 amostras que estavam abaixo do limite de detecção do *kit*, foi possível discriminar 8 grupos de amostras, através da concentração de alquenais.

3.3.2.2 p-anisidina

Quanto aos valores de p-anisidina, as amostras foram diferentes entre si ao nível de 5% de significância. As 18 amostras avaliadas se distribuíram em apenas 5 grupos de diferentes valores de p-anisidina ao nível de 5% de significância (Tabela 7).

Tabela 7. Números de p-anisidina médios, em ordem decrescente, obtidas pelo método oficial para amostras de ração.

Amostra	anisidina
D	46,2 ^a
O	27,3 ^b
M	17,3 ^{bc}
Q	12,9 ^{cd}
R	12,8 ^{cd}
P	10,0 ^{cde}
J	8,9 ^{cde}
N	7,6 ^{cdef}
S	6,8 ^{cdef}
B	5,6 ^{def}
K	1,4 ^{efg}
E	0,9 ^{efg}
C	0,5 ^{efg}
A	-3,2 ^{fg}
G	-7,1 ^g
H	-7,3 ^g
F	-8,6 ^g
L	-9,3 ^g

Tendo como parâmetro o valor de p-anisidina para o óleo de soja não oxidado de 8,5 \pm 1,5 (Capítulo 5), as amostras de ração, em geral, apresentaram valores próximos ou inferiores a esse. Com exceção das amostras D e O, que apresentaram valores mais elevados

de p-anisidina, pode-se considerar que as amostras estão pouco oxidadas. A disparidade nos valores, variando de -9,3 a 46,2 pode ser atribuída a diferenças na composição em ácidos graxos dos lipídios. É sabido que a taxa de oxidação varia de acordo com o grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo de 100 para o ácido oléico (18:1), 1.200 para o linoléico (18:2) e 2.500 para o linolênico (18:3), todos em relação ao esteárico (18:0) (BELITZ; GROSCH, 1999).

Contraopondo-se aos resultados do teste de p-anisidina, a amostra D foi uma das amostras de menor concentração de alquenais e a amostra O, apresentou um valor intermediário (Tabela 6). Essa incoerência pode ser explicada pelas condições favoráveis à oxidação inerentes ao método convencional, estendendo-se desde a extração de lipídios até as análises: elevado tempo de análise, excessiva manipulação das amostras e, possivelmente, composição em ácidos graxos desfavorável.

3.4 Concentração de malonaldeído e teste de TBA

Das 18 amostras de ração analisadas, as amostras G, H, J, K, L e N apresentaram níveis de malonaldeído abaixo do limite de detecção do *kit* AldeSafe™ STD (Apêndice J-5). O mesmo havia ocorrido para o teste de p-anisidina, porém, nem todas as amostras coincidem. Como a obtenção de valores negativos é uma condição irreal, isto ocorreu porque, além das amostras estarem pouco oxidadas, para o calibrador 1 (1º ponto da curva de calibração), correspondente a 0 nmol, os valores de absorvância observados nas curvas de calibração (Tabelas 1 e 3 do mesmo Apêndice) foram negativos ao serem lidos contra a água desmineralizada. Sendo assim, outros estudos devem ser realizados, substituindo o calibrador 1 pela própria água desmineralizada para avaliar se esse valor interfere na equação da curva de calibração e no valor do coeficiente de correlação desta.

As concentrações de malonaldeído observadas nas amostras foram de 7,5 a 152,3 nmol/kg de lipídio, enquanto que os números de TBA variaram de 0,009 a 0,076. Para ambas as metodologias, os valores foram muito baixos, indicando que as amostras estavam pouco oxidadas.

3.4.1 Análise do modelo

A Figura 9 corresponde à correlação entre os valores de malonaldeído obtidos pelo *kit* AldeSafe™ STD e os números de TBA. De modo análogo às tentativas de correlação dos *kits* PeroxySafe™ MSA e AlkalSafe™ STD para as mesmas amostras, não houve correlação entre os métodos, com valor de r muito baixo (0,32), explicando apenas 10% da variação das concentrações de malonaldeído. As baixas amplitudes dos valores de TBA, correspondendo à ordem de grandeza de 10^{-2} , e de malonaldeído podem ser as responsáveis pelo fato ocorrido.

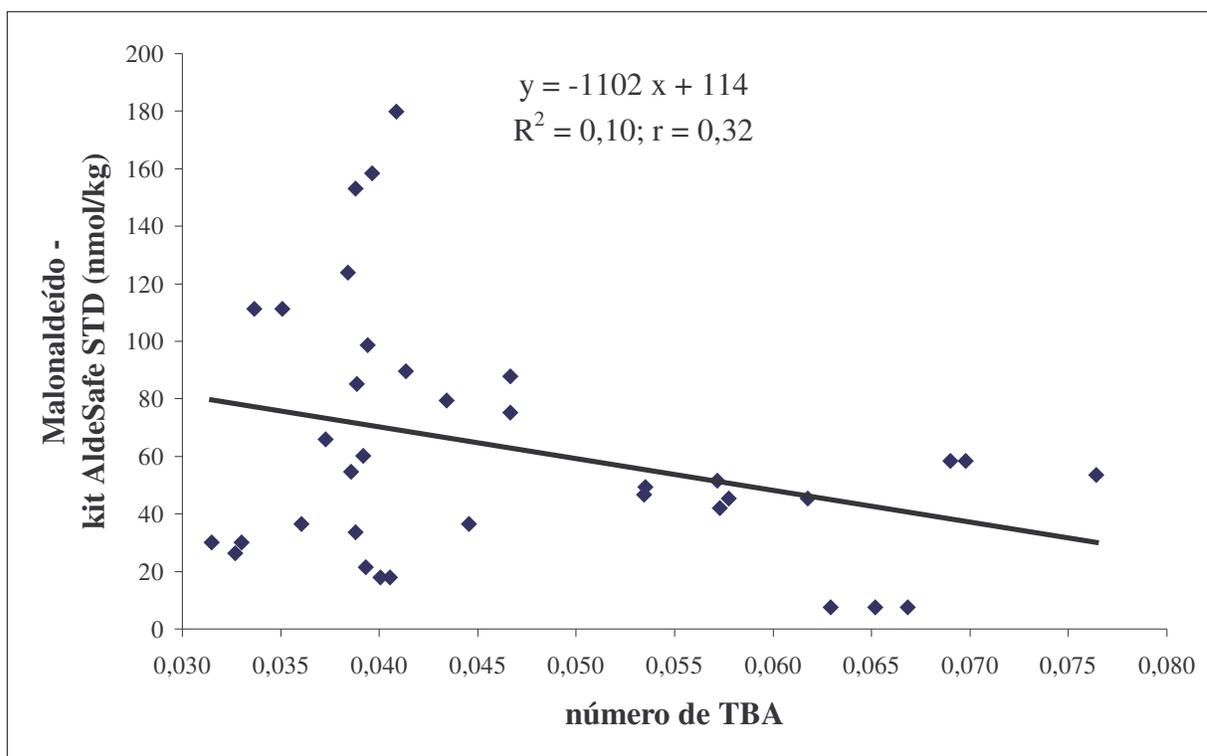


Figura 9. Gráfico da correlação entre as concentrações de malonaldeído obtidas pelo *kit* AldeSafe™ STD, em nmol/kg, e os números de TBA de amostras de ração, com as bandas de 95% de confiança (BC) e de 95% de predição (BP).

Os resultados de ANOVA (Tabela 8) confirmam que o modelo não é válido ($F_{\text{Calc}} < F_{\text{Tab}}$).

Tabela 8. ANOVA para a regressão linear - *kit* AldeSafe™ STD.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab}	p
Regressão	6624	1	6624	3,83	≈ 4,04	0,059
Erro Residual	58803	34	1730			
Total	65427	35				

3.4.2 Comparação de médias para uma mesma metodologia

Na ANOVA com os valores obtidos tanto pelo *kit* AldeSafe™ STD como pelo teste de TBA, as amostras diferiram entre si ao nível de 5% de significância.

Observando comparativamente as Tabelas 9 e 10, onde se tem a distribuição das amostras em ordem decrescente do parâmetro avaliado (concentração de malonaldeído ou número de TBA) e amostras com mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância, apesar do *kit* ter detectado 12 amostras contra as 18 avaliadas no teste de TBA, as amostras se dividiram em praticamente o mesmo número de grupos de médias para os dois parâmetros. Similarmente ao que ocorreu para o *kit* AlkalSafe™ STD e p-anisidina, a seqüência não foi a mesma para o *kit* AldeSafe™ STD e TBA.

Tabela 9. Concentrações médias de malonaldeído, em nmol/kg, em ordem decrescente, obtidas pelo *kit* AldeSafe STD™ para amostras de ração.

Amostra	Conc. malonaldeído (nmol/kg)
S	138,7 ^a
M	106,90 ^b
O	84,6 ^c
Q	71,5 ^{cd}
E	56,8 ^{de}
F	46,8 ^{ef}
D	46,6 ^{ef}
L	43,1 ^{ef}
C	35,5 ^{fg}
P	25,2 ^{gh}
A	19,1 ^{hi}
B	7,58 ⁱ

Tabela 10. Números de TBA médios, em ordem decrescente, obtidos pelo método oficial para amostras de ração.

Amostra	TBA
E	0,072 ^a
B	0,065 ^{ab}
D	0,058 ^b
F	0,056 ^{bc}
G	0,056 ^{bc}
O	0,046 ^{cd}
N	0,041 ^{de}
C	0,040 ^{de}
A	0,040 ^{de}
S	0,040 ^{de}
M	0,040 ^{de}
R	0,038 ^{de}
Q	0,036 ^{de}
H	0,034 ^c
P	0,033 ^c
J	0,032 ^{ef}
K	0,022 ^f
L	0,009 ^g

Analisando os resultados obtidos de malonaldeído e de alquenais pelos respectivos *kits*, apesar do fato de seis amostras estarem abaixo dos limites de detecção, conclui-se que esses *kits* podem ser considerados mais sensíveis, uma vez que suas escalas intuitivamente realçam as diferenças entre o estágio oxidativo de amostras diferentes. Enquanto os testes de TBA e p-anisidina forneceram valores inferiores à unidade, seus respectivos *kits* geraram valores de concentração da ordem de 10^2 e 10^3 . Em termos de oxidação lipídica, os valores de TBA e/ou p-anisidina inferiores a 1 não representam necessariamente que as amostras sejam diferentes entre si.

4 CONCLUSÕES

O *kit* de determinação de %AGL se correlacionou com o método oficial de forma satisfatória ($r = 0,88$) e os resultados obtidos necessitaram de fator de correção médio de 1,25 para que não houvesse diferença significativa em relação ao método oficial.

As amostras de ração não foram adequadas para a correlação dos *kits* de determinação de peróxidos, malonaldeído e alquenais com os respectivos métodos oficiais da AOCS, devido ao estado oxidativo pouco avançado, apesar de todas as amostras estarem vencidas no momento das análises, à presença de antioxidantes e/ou predominância de ácidos graxos saturados na composição lipídica. Outros estudos de correlação devem ser conduzidos com amostras em estágio mais avançado de oxidação.

Não houve coerência entre os resultados obtidos nas determinações com os *kits* PeroxySafe™ MSA, AldeSafe™ STD e AlkalSafe™ STD e os métodos convencionais de peróxidos, TBA e p-anisidina, respectivamente. O longo tempo das análises e condições favoráveis à oxidação de lipídios dos métodos convencionais, desde a extração até as análises, podem ter sido os responsáveis por tal fato e podem ter fornecido informações pouco precisas. Para as determinações de peróxidos, a modificação do método oficial não foi adequada, pois a detecção do ponto final da titulação foi de difícil visualização.

Os *kits* DiaMed F.A.T.S. destinados a matrizes complexas podem fornecer informações úteis na avaliação da oxidação lipídica, reduzindo consideravelmente o tempo e o custo das análises, a quantidade de amostra, os resíduos gerados e os solventes necessários para a extração de lipídios. Neste estudo, por exemplo, o teor lipídico máximo presente nas amostras foi ao redor de 25% e o mínimo, 10%. Considerando a ineficiência da extração a frio e as perdas, a quantidade de óleo/gordura obtida é um fator limitante para que se efetue um adequado controle de qualidade do produto. Para se ter uma idéia, de acordo com os resultados obtidos, apenas para uma única determinação de ácidos graxos livres (AOCS Ca 5a-40) e de índice de peróxidos (AOCS Cd 8b-90), seriam necessários, respectivamente, 7 g e 5 g de lipídio extraído, quantidades muito elevadas, se comparados com os 100 µL e 50 µL requeridos, respectivamente, para as análises com os *kits* AciSafe™ e PeroxySafe™. As quantidades requeridas pela metodologia oficial corresponderiam a cerca de 144 a 360 g de

amostra e 216 mL a 540 mL de solvente (!!!), de acordo com o teor lipídico, para as determinações em triplicata de uma única amostra, desconsiderando as perdas. Baseado nestes dados, estudos de vida-de-prateleira, através dos métodos convencionais, são economicamente inviáveis, ressaltando a necessidade dos *kits*.

5 REFERÊNCIAS

ALIMENTOS PARA BICHOS DE ESTIMAÇÃO. **Herbário**, 16 set. 2002. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br/bot/agri/alipet.htm>>. Acesso em 01 nov. 2004. 11h05min.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 2004.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2. ed. Berlin: Springer, 1999. cap. 3.

CHARNET, R. et al. **Análise de modelos de regressão linear**. Campinas: Editora da Unicamp, 1999. 356 p.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. 12. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1992. 264 p.

COUNCIL, K. A. **Analysis of variance**. In: HELWIG, J. T. (Ed.). **SAS Introductory guide**. 3 ed. Cary: SAS Institute Inc., 1985. p. 55-60.

CUTAIT, M. S. Entrevista. **Global 21**, 24 set. 2004. Disponível em: <<http://www.global21.com.br/entrevistas/entrevista.asp?cod=242>>. Acesso em 01 nov. 2004. 11h22min.

DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J. Analysis of lipid hydroperoxides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, p. 420-428, 2002.

GURR, M. I. **Role of fats in food and nutrition**. Barking: Elsevier, 1984. p. 46.

GUTKOSKI, L. C. **Características tecnológicas de frações de moagem de aveia e efeito de umidade e temperatura de extrusão na sua estabilidade**. 1997. 241 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

HAMILTON, R. J.; ROSELL, J. B (Ed.). **Analysis of oils and fats**. New York: Elsevier, 1986, 441 p.

LESS, R. **Manual de análisis de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1979. p. 18-20, 183-185.

LIMA, E. A cachorrada está com tudo. **Veja São Paulo**, São Paulo, n. 8, p. 10-22, 25 fev. 2004.

MESQUITA, A. C. Bichos de estimação, Fortaleza, 9 out. 2004. Disponível em: <<http://www.noolhar.com/opovo/cienciaesaude/408046.html>>. Acesso em 01 nov. 2004. 11h16min.

MINITAB USER'S GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. 285 p.

MINITAB REFERENCE GUIDE: release 10 for windows. Pennsylvania: Minitab Inc., 1994. v. 1.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3 ed. Singapore: John Wiley, 1991. 649 p.

_____.; PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis**. 2 ed. New York: John Wiley, 1992, 527 p.

MORITA, T.; ASSUNÇÃO, R. M.; **Manual de soluções, reagentes & solventes**: padronização, preparação, purificação. 11. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 629 p.

NIELSEN, S. S. **Food analysis**. 2a ed. Maryland: Aspen, 1998.

PAGEL, G. Brasil é o segundo maior mercado pet do mundo. **Agência de Notícias Brasil-Árabe**. Disponível em: <<http://www.anba.com.br/especial.php?id=149>>. Acesso em 01 nov. 2004. 11h53min.

PIÑOL, J. M. G.; BORONAT, M. C. de la T. Influencia de la tecnología en el valor nutritivo de los alimentos: lípidos. **Alimentaria**, v. 204, p. 15-21, 1989.

RAÇÃO PARA PEQUENOS ANIMAIS EM ALTA. **Herbário**, 23 dez. 2002. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br/dataherb13/2312racaopet.htm>>. Acesso em 01 nov. 2004. 11h02min.

RYAN JÚNIOR, T. A.; JOINER, B. L.; RYAN, B. F. **Minitab student handbook**. Massachusetts: Duxbury, 1976. 337 p.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, J. P. D.; Extraction and analysis of lipids. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. (Ed.). **Food lipids**: chemistry, nutrition, and biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1998. cap. 5.

SAFETY ASSOCIATES. Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John Sorensen, John F. Elias, Virginia C. Gordon. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. CA n. PI 2267226, 30 set. 1997, 09 abr. 1998.

_____. John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi, Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 4197235, 27 fev. 2004, 07 out. 2004.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. AU n. PI 759265, 21 out. 1998, 29 abr. 1999.

_____. Virginia C. Gordon, Bennett W. Root Jr., Barbara J. Peasley, John F. Elias, John Sorensen, Michal Mittelstein, Soheila Mirhashemi. **Method and apparatus for determining specific analytes in various matrices**. US n. PI 3064423, 26 mar. 2003, 03 abr. 2003.

_____. Virginia C. Gordon, John Sorensen, Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John F. Elias. **Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices**. US n. PI 6489132, 02 set. 1999, 03 dez. 2002.

SOARES JÚNIOR, M. S. **Características físicas e valor biológico de rações aquáticas elaboradas em extrusor de dupla rosca com diferentes níveis de substitutos de farelo de soja pela soja integral**. 2000. 167 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

6 AGRADECIMENTOS

À DiaMed AG (Suíça) pelo financiamento da pesquisa e fornecimento dos *kits* e à Total Alimentos pelas rações cedidas.

CONCLUSÕES GERAIS

Os *kits* FaSafe™ STD, FaSafe™ HSY, AciSafe™ MSA, PeroxySafe™ STD, PeroxySafe™ HSY e AlkalSafe™ STD correlacionaram-se com os métodos oficiais da AOCS de determinação de ácidos graxos livres (Ca 5a-40), peróxidos (Cd 8b-90) e p-anisidina (Cd 18b-90). Os coeficientes de correlação, obtidos através do Método dos Mínimos Quadrados de Regressão Linear, foram 0,99; 0,99; 0,88; 0,94; 0,93 e 0,74, respectivamente.

Correções nos valores obtidos pelos *kits* AciSafe™ MSA e PeroxySafe™ STD devem ser feitas, multiplicando os resultados por 1,25 e 0,80, respectivamente, a fim de não se verificar diferenças significativas em relação aos valores gerados pelos métodos da AOCS.

Quando aplicado a óleos brutos e degomados, a correlação não foi possível. Por serem testes colorimétricos, o elevado teor de pigmentos presentes em tais amostras interferiram no testes com os *kits*.

Ao serem empregados na avaliação de rações, os *kits* AldeSafe™ STD, PeroxySafe™ MSA e AlkalSafe™ STD não apresentaram correlação com os métodos oficiais, devido ao estágio oxidativo pouco avançado das amostras selecionadas, mesmo que todas estivessem com datas de validade vencidas e consideradas, assim, inapropriadas para o consumo.

A utilização de amostras de óleos de fritura não foi adequada nas determinações de TBA. Ainda assim, o *kit* AldeSafe™ STD apresentou sensibilidade superior à do método de TBA para as mesmas amostras.

Foram constatadas deficiências nos métodos oficiais de determinação de peróxido, malonaldeído e alquenais. O método iodométrico de determinação de peróxido foi pouco sensível a valores inferiores a 2 meq/kg. O teste de TBA é altamente empírico e o aquecimento empregado desencadeou a formação de malonaldeído adicional, superestimando os números de TBA. Em relação ao teste de p-anisidina, a interferência da água não pôde ser eliminada e não houve consenso nos valores obtidos na literatura para o mesmo tipo de amostra em condições similares.

Por tudo, conclui-se que os *kits* que compõem o Sistema DiaMed F.A.T.S. podem ser utilizados para se avaliar o estado oxidativo de óleos, gorduras e produtos que os contenham na ausência de interferentes dos testes, com inúmeras vantagens se comparados aos métodos convencionais. Nesse estudo, foi possível a correlação de 6 *kits*, dos 10 existentes, com seus respectivos métodos da AOCS: FaSafe™ STD e HSY, AciSafe™ MSA, PeroxySafe™ STD e HSY e AlkalSafe™ STD.

Merecem particular atenção os *kits* destinados a matrizes simples e complexas, devido à redução significativa do tempo de análise, quantidades de amostras, reagentes e resíduos gerados, viabilizando estudos de vida-de-prateleira de produtos com teores lipídicos relativamente baixos.

APÊNDICE A - Procedimento de extração de gordura de matrizes complexas

Para amostras cuja composição não é somente lipídica, o óleo/gordura deve ser extraído antes de proceder as análises.

1 Material utilizado

- Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;
- Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S.;
- Moedor Diamed F.A.T.S.;
- Incubadora Diamed F.A.T.S.;
- Bomba de filtração Diamed F.A.T.S., filtros e tampas;
- Pipeta graduada de 1, 2 ou 5 mL, de acordo com o volume necessário de reagente de preparação;
- Balança analítica;
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e tampas;
- Suporte para tubos de ensaio.

2 Procedimento

Com o auxílio do Moedor Diamed F.A.T.S., triture as amostras finamente.

De acordo com a diluição desejada, pese em tubo de ensaio a quantidade de amostra necessária, utilizando balança analítica. Por exemplo, para o fator de diluição (FD) de 4,0, pese $1,00 \pm 0,05$ g de amostra

Com auxílio de pipeta graduada, adicione a quantidade de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S. equivalente ao fator de diluição adotado. Para $FD = 4,0$, adicione 3,0 mL.

Tampe o tubo de ensaio e agite durante 1 minuto no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. em velocidade máxima.

A seguir, condicione o tubo de ensaio na Incubadora Diamed F.A.T.S. pré aquecida a 40°C durante 15 minutos.

Transfira o conteúdo para a Bomba de Filtração Diamed F.A.T.S., devidamente acoplada com os filtros e tubos de ensaio. Tampe os filtros e selecione o programa 1 (600 mBar por 1 minuto) para a extração do óleo.

Obtido o óleo, proceder com as análises.

APÊNDICE B-1 - Procedimentos de análises com o *kit* FaSafe™ STD

Os reagentes, controles e calibradores devem ser mantidos sob refrigeração. Antes do início dos testes, mantenha-os à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos.

1 Reagentes utilizados

- Reagente A FaSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente B FaSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 5 calibradores FaSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 3 controles STD Diamed F.A.T.S.; e,
- Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

2 Material utilizado

- Analisador Diamed F.A.T.S.;
- Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S.;
- Dispensador FaSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,35 mL);
- Pipeta de repetição Diamed F.A.T.S.;
- Pipeta ajustável entre 20 e 200 µL;
- Ponteiras de 2,5 mL e de 20-200 µL;
- Suporte para dispensador;
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e tampas; e,
- Suporte para tubos de ensaio.

3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.

Após ligado o Analisador Diamed F.A.T.S. (220V), inserido o filtro 570/690 no compartimento de filtro e aquecido por 10 minutos, proceda com a programação para o teste com o *kit* FaSafe™ STD.

- a) aperte botão “*Option*” do equipamento e escolha a opção “*enter / edit protocol*” e, a seguir, “*FaSafe STD*”. Entre com os dados da Tabela 1 na seqüência em que vão aparecendo na tela.

Tabela 1. Programação para leituras das análises com o *kit FaSafe™ STD*.

Name Protocol	FAS.STD
Data reduction	polygonal
Transformation	linear / linear
# of calibrators	5
Calibrator Replicates	1
Calibrator concentration #1	0,03
Calibrator concentration #2	0,2
Calibrator concentration #3	0,6
Calibrator concentration #4	1
Calibrator concentration #5	2
Correlation Flag	0,99
Units	%oleic
Normal range Hi	2,2
Normal range Lo	0,2
# of controls	0
# of Rgt Blanks	0
Read mode <> end point	Aperte <i>Enter</i>
Wavelength	570
Rep. %CV Flag	10
Store Protocols	yes

Peça a impressão das condições do teste, opte pelo botão “yes” após a pergunta “*list protocol?*”.

Para a construção da curva de calibração, aperte o botão “RUN” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit FaSafe™ STD* e aperte o botão “Enter”. Escolha o número de repetições para cada amostra na opção “*Sample replicates*” e aperte o botão “Enter”.

Em seguida, insira o tubo branco (água desmineralizada) quando solicitado (“*insert blank tube*”) para que a leitura seja feita.

4 Construção da curva de calibração

- a) enumere 5 tubos de vidro 12 x 75 mm de “C1” a “C5”;
- b) usando a pipeta PDP, transfira 100 μL de cada calibrador nos respectivos tubos;
- c) usando o dispensador FaSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,35 mL) ou pipeta apropriada, transfira 2,35 mL de Reagente A FaSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- d) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “3” e despeje uma vez (equivalente a 150 μL) do Reagente B FaSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- e) tampe os tubos e agite por inversão no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 10 minutos \pm 30 segundos a 18-25°C, na velocidade 4;
- f) após realizadas as etapas de programação do Analisador Diamed F.A.T.S. e lido o tubo branco (água desmineralizada), faça a leitura dos calibradores 1 a 5. Deve-se atentar para que o exterior dos tubos esteja bem limpo. Recomenda-se limpá-los com papel higiênico, antes das leituras;
- g) serão impressos os parâmetros da curva (inclinação, interseção e r) e a tabela concentração x absorvância x diferença predita (%);
- h) avaliada a curva de calibração construída (vide item 8), responder “yes” à pergunta “*edit calibrators?*”, caso necessite excluir um ponto, reconsiderar o ponto excluído ou entrar com os dados manualmente, ou “no” para aceitar a curva. Para excluir, com as setas \uparrow ou \downarrow , escolha a opção “*delete a point*” e escolha o ponto referente ao calibrador a ser excluído. Escolha a opção “*continue run*” para prosseguir com as análises.

5 Teste dos controles

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas de *a)* a *f)* do item 4), consecutivamente, para os controles *low*, *medium* and *high*. Enumere 9 tubos, se o teste for realizado em triplicata, da seguinte forma: “L1” a “L3” (controle *low*); “M1” a “M3” (controle *medium*) e “H1” a “H3” (controle *high*).

Avalie se os controles estão dentro do limite previsto (Tabela 2). Em caso negativo, refaça a curva de calibração e, a seguir, o teste dos controles. Sob determinadas condições, são admitidas diferenças de até 10%, em relação ao limite inferior ou superior da faixa.

Analogamente, se o valor do Coeficiente de Variação dos controles ultrapassar 10%, refaça o teste.

Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de %AGL para os controles STD.

Controles STD	Faixa esperada (% oléico)
Low	0,3-0,4
Medium	0,6-0,7
High	1,2-1,4

6 Amostras

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas *a* a *f* (item 4) para as amostras. Opte por letras para discriminar amostras diferentes e números, para a repetição. Por exemplo, o código “B3” equivale à terceira determinação da amostra B.

Note que para valores acima da faixa de concentração calibrada, indicados por “Hi” na impressão, o teste deve ser refeito com as amostras diluídas (usando Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.).

Se o valor do Coeficiente de Variação ultrapassar 10%, refaça o teste.

7 Diluições

As diluições devem ser feitas, tendo em vista que a faixa de detecção do *kit* FaSafe™ STD é de 0,2 a 2,2% ácido oléico.

7.1 Procedimento

- em tubo de ensaio, adicione a quantidade de amostra determinada para o fator de diluição (FD) conveniente, utilizando pipeta PDP;
- adicione a respectiva quantidade de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., utilizando dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,1 mL);
- tampe o tubo de ensaio;

- d) agite em velocidade máxima no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 1 min ± 5 segundos;
- e) prossiga com a determinação de ácidos graxos livres, seguindo as etapas do item 6; e,
- f) do resultado obtido, multiplique pelo fator de diluição correspondente.

7.2 Exemplos de diluições

A seguir, alguns exemplos de diluições:

- a) FD = 11,5:

200 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.:

$$FD = \frac{(2,1 + 0,2)}{0,2} = 11,5$$

- b) FD = 15:

150 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

- c) FD = 22:

100 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

8 Notas

- a) o valor de r deve ser da ordem de 0,99. Caso isso não ocorra, repita a curva de calibração;
- b) as diferenças preditas (%) devem ser mínimos, sendo desejável valores inferiores a 10%;
- c) ao se optar por excluir um dos pontos da reta, o valor da absorbância do ponto excluído deve estar próximo ao valor real, quando calculado pela equação da nova curva de calibração, partindo do valor de concentração; e,
- d) apesar de não ser recomendável, é possível utilizar a última curva de calibração construída, armazenada no *software*. Para isso, aperte o botão “STAT” e selecione, com as setas ↑ ou ↓, o *kit* FaSafe™ STD. Em seguida, faça a leitura do tubo branco e das amostras analisadas.

9 Resultados do trabalho

Na expressão dos resultados, o valor obtido pelo *kit* FaSafe™ STD não necessita de fator de correção, em comparação com o método oficial AOCS Ca 5a-40.

APÊNDICE B-2 - Procedimentos de análises com o *kit* FaSafe™ HSY

Os reagentes, controles e calibradores devem ser mantidos sob refrigeração. Antes do início dos testes, mantenha-os à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos.

1 Reagentes utilizados

- Reagente A FaSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente B FaSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 5 calibradores FaSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 3 controles HSY Diamed F.A.T.S.; e,
- Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

2 Material utilizado

- Analisador Diamed F.A.T.S.;
- Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S.;
- Dispensador FaSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,35 mL);
- Pipeta de repetição Diamed F.A.T.S.;
- Pipeta ajustável entre 20 e 200 µL;
- Ponteiras de 2,5 mL e de 20-200 µL;
- Suporte para dispensador;
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e tampas; e,
- Suporte para tubos de ensaio.

3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.

Após ligado o Analisador Diamed F.A.T.S. (220V), inserido o filtro 570/690 no compartimento de filtro e aquecido por 10 minutos, proceda com a programação para o teste com o *kit* FaSafe™ HSY.

- b) aperte botão “Option” do equipamento e escolha a opção “*enter / edit protocol*” e, a seguir, “*FaSafe HSY*”. Entre com os dados da Tabela 1, na seqüência em que vão aparecendo na tela.

Tabela 1. Programação para leituras das análises com o *kit FaSafe™ HSY*.

Name Protocol	FAS.HSY
Data reduction	linear regression
Transformation	linear / linear
# of calibrators	5
Calibrator Replicates	1
Calibrator concentration #1	0
Calibrator concentration #2	0,05
Calibrator concentration #3	0,1
Calibrator concentration #4	0,15
Calibrator concentration #5	0,2
Correlation Flag	0,99
Units	%oleic
Normal range Hi	0,22
Normal range Lo	0,02
# of controls	0
# of Rgt Blanks	0
Read mode <> end point	Aperte <i>Enter</i>
Wavelength	570
Rep. %CV Flag	10
Store Protocols	yes

Peça a impressão das condições do teste, opte pelo botão “yes” após a pergunta “*list protocol?*”.

Para a construção da curva de calibração, aperte o botão “RUN” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit FaSafe™ HSY* e aperte o botão “Enter”. Escolha o número de repetições para cada amostra na opção “*Sample replicates*” e aperte o botão “Enter”.

Em seguida, insira o tubo branco (água desmineralizada) quando solicitado (“*insert blank tube*”) para que a leitura seja feita.

4 Construção da curva de calibração

- a) enumere 5 tubos de vidro 12 x 75 mm de “C1” a “C5”;
- b) usando a pipeta PDP, transfira 100 μL de cada calibrador nos respectivos tubos;
- c) usando o dispensador FaSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,35 mL) ou pipeta apropriada, transfira 2,35 mL de Reagente A FaSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- d) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “3” e despeje uma vez (equivalente a 150 μL) do Reagente B FaSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- e) tampe os tubos e agite por inversão no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 10 minutos \pm 30 segundos a 18-25°C, na velocidade 4;
- f) após realizadas as etapas de programação do Analisador Diamed F.A.T.S. e lido o tubo branco (água desmineralizada), faça a leitura dos calibradores 1 a 5. Deve-se atentar para que o exterior dos tubos esteja bem limpo. Recomenda-se limpá-los com papel higiênico, antes das leituras;
- g) serão impressos os parâmetros da curva (inclinação, interseção e r) e a tabela concentração x absorvância x diferença predita (%);
- h) avaliada a curva de calibração construída (vide item 8), responder “yes” à pergunta “*edit calibrators?*”, caso necessite excluir um ponto, reconsiderar o ponto excluído ou entrar com os dados manualmente, ou “no” para aceitar a curva. Para excluir, com as setas \uparrow ou \downarrow , escolha a opção “*delete a point*” e escolha o ponto referente ao calibrador a ser excluído. Escolha a opção “*continue run*” para prosseguir com as análises.

5 Teste dos controles

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas de *a*) a *f*) do item 4), consecutivamente, para os controles *low*, *medium* and *high*. Enumere 9 tubos, se o teste for realizado em triplicata, da seguinte forma: “L1” a “L3” (controle *low*); “M1” a “M3” (controle *medium*) e “H1” a “H3” (controle *high*).

Avalie se os controles estão dentro do limite previsto (Tabela 2). Em caso negativo, refaça a curva de calibração e, a seguir, o teste dos controles. Sob determinadas condições, são admitidas diferenças de até 10%, em relação ao limite inferior ou superior da faixa.

Analogamente, se o valor do Coeficiente de Variação dos controles ultrapassar 10%, refaça o teste.

Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de %AGL para os controles HSY.

Controles HSY	Faixa esperada (% oléico)
Low	0,04-0,06
Medium	0,07-0,09
High	0,15-0,17

6 Amostras

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas *a* a *f* (item 4) para as amostras. Opte por letras para discriminar amostras diferentes e números, para a repetição. Por exemplo, o código “B3” equivale à terceira determinação da amostra B.

Note que para valores acima da faixa de concentração calibrada, indicados por “Hi” na impressão, o teste deve ser refeito com as amostras diluídas (usando Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.).

Se o valor do Coeficiente de Variação ultrapassar 10%, refaça o teste.

7 Diluições

As diluições devem ser feitas, tendo em vista que a faixa de detecção do *kit* FaSafe™ HSY é de 0,02 a 0,22% ácido oléico.

7.1 Procedimento

- em tubo de ensaio, adicione a quantidade de amostra determinada para o fator de diluição (FD) conveniente, utilizando pipeta PDP;
- adicione a respectiva quantidade de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., utilizando dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,1 mL);
- tampe o tubo de ensaio;

- d) agite em velocidade máxima no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 1 min ± segundos;
- e) prossiga com a determinação de ácidos graxos livres, seguindo as etapas do item 6; e,
- f) do resultado obtido, multiplique pelo fator de diluição correspondente.

7.2 Exemplos de diluições

A seguir, alguns exemplos de diluições:

- a) FD = 11,5:

200 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.:

$$FD = \frac{(2,1 + 0,2)}{0,2} = 11,5$$

- b) FD = 15:

150 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

- c) FD = 22:

100 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

8 Notas

- a) o valor de r deve ser da ordem de 0,99. Caso isso não ocorra, repita a curva de calibração;
- b) as diferenças preditas (%) devem ser mínimos, sendo desejável valores inferiores a 10%;
- c) ao se optar por excluir um dos pontos da reta, o valor da absorbância do ponto excluído deve estar próximo ao valor real, quando calculado pela equação da nova curva de calibração, partindo do valor de concentração; e,
- d) apesar de não ser recomendável, é possível utilizar a última curva de calibração construída, armazenada no *software*. Para isso, aperte o botão “STAT” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit* FaSafe™ HSY. Em seguida, faça a leitura do tubo branco e das amostras analisadas.

9 Resultados do trabalho

Na expressão dos resultados, o valor obtido pelo *kit* FaSafe™ HSY não necessita de fator de correção, em comparação com o método oficial AOCS Ca 5a-40.

APÊNDICE B-3 - Procedimentos de análises com o *kit* AciSafe™ MSA

Os reagentes, controles e calibradores devem ser mantidos sob refrigeração. Antes do início dos testes, mantenha-os à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos.

Os procedimentos aqui descritos são válidos para o óleo já extraído da amostra, conforme descrito em item específico.

1 Reagentes utilizados

- Reagente A AciSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente B AciSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 5 calibradores AciSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 3 controles MSA Diamed F.A.T.S.; e,
- Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

2 Material utilizado

- Analisador Diamed F.A.T.S.;
- Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S.;
- Dispensador AciSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,35 mL);
- Pipeta de repetição Diamed F.A.T.S.;
- Pipeta ajustável entre 20 e 200 µL;
- Ponteiras de 2,5 mL e de 20-200 µL;
- Suporte para dispensador;
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e tampas; e,
- Suporte para tubos de ensaio.

3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.

Após ligado o Analisador Diamed F.A.T.S. (220V), inserido o filtro 570/690 no compartimento de filtro e aquecido por 10 minutos, proceda com a programação para o teste com o *kit* AciSafe™ MSA.

c) aperte botão “Option” do equipamento e escolha a opção “*enter / edit protocol*” e, a seguir, “*Acisafe MSA*”. Entre com os dados da Tabela 1, na seqüência em que vão aparecendo na tela.

Tabela 1. Programação para leituras das análises com o *kit* AciSafe™ MSA.

Name Protocol	ACIS.MSA
Data reduction	polygonal
Transformation	linear / linear
# of calibrators	5
Calibrator Replicates	1
Calibrator concentration #1	0,03
Calibrator concentration #2	0,2
Calibrator concentration #3	0,6
Calibrator concentration #4	1
Calibrator concentration #5	2
Correlation Flag	0,99
Units	%oleic
Normal range Hi	2,2
Normal range Lo	0,2
# of controls	0
# of Rgt Blanks	0
Read mode <> end point	Aperte <i>Enter</i>
Wavelength	570
Rep. %CV Flag	10
Store Protocols	yes

Peça a impressão das condições do teste, opte pelo botão “yes” após a pergunta “*list protocol?*”.

Para a construção da curva de calibração, aperte o botão “RUN” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit* AciSafe™ MSA e aperte o botão “Enter”. Escolha o número de repetições para cada amostra na opção “*Sample replicates*” e aperte o botão “Enter”.

Em seguida, insira o tubo branco (água desmineralizada) quando solicitado (“*insert blank tube*”) para que a leitura seja feita.

4 Construção da curva de calibração

- a) enumere 5 tubos de vidro 12 x 75 mm de “C1” a “C5”;
- b) usando a pipeta PDP, transfira 100 µL de cada calibrador nos respectivos tubos;
- c) usando o dispensador AciSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,35 mL) ou pipeta apropriada, transfira 2,35 mL de Reagente A AciSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- d) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “3” e despeje uma vez (equivalente a 150 µL) do Reagente B AciSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- e) tampe os tubos e agite por inversão no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 10 minutos ± 30 segundos a 18-25°C, na velocidade 4;
- f) após realizadas as etapas de programação do Analisador Diamed F.A.T.S. e lido o tubo branco (água desmineralizada), faça a leitura dos calibradores 1 a 5. Deve-se atentar para que o exterior dos tubos esteja bem limpo. Recomenda-se limpá-los com papel higiênico, antes das leituras;
- g) serão impressos os parâmetros da curva (inclinação, interseção e r) e a tabela concentração x absorvância x diferença predita (%);
- h) avaliada a curva de calibração construída (vide item 8), responder “yes” à pergunta “*edit calibrators?*”, caso necessite excluir um ponto, reconsiderar o ponto excluído ou entrar com os dados manualmente, ou “no” para aceitar a curva. Para excluir, com as setas ↑ ou ↓, escolha a opção “*delete a point*” e escolha o ponto referente ao calibrador a ser excluído. Escolha a opção “*continue run*” para prosseguir com as análises.

5 Teste dos controles

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas de *a*) a *f*) do item 4), consecutivamente, para os controles *low*, *medium* and *high*. Enumere 9 tubos, se o teste for realizado em triplicata, da seguinte forma: “L1” a “L3” (controle *low*); “M1” a “M3” (controle *medium*) e “H1” a “H3” (controle *high*).

Avalie se os controles estão dentro do limite previsto (Tabela 2). Em caso negativo, refaça a curva de calibração e, a seguir, o teste dos controles. Sob determinadas condições, são admitidas diferenças de até 10%, em relação ao limite inferior ou superior da faixa.

Analogamente, se o valor do Coeficiente de Variação dos controles ultrapassar 10%, refaça o teste.

Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de %AGL para os controles MSA.

Controles MSA	Faixa esperada (% oléico)
Low	0,3-0,5
Medium	0,7-0,9
High	1,4-1,7

6 Amostras

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas *a* a *f* (item 4) para as amostras. Opte por letras para discriminar amostras diferentes e números, para a repetição. Por exemplo, o código “B3” equivale à terceira determinação da amostra B.

Note que para valores acima da faixa de concentração calibrada, indicados por “Hi” na impressão, o teste deve ser feito com as amostras diluídas (usando Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.).

Se o valor do Coeficiente de Variação ultrapassar 10%, refaça o teste.

7 Diluições

As diluições devem ser feitas, tendo em vista que a faixa de detecção do *kit* AciSafe™ MSA é de 0,2 a 2,2% ácido oléico.

7.1 Procedimento

- c) em tubo de ensaio, adicione a quantidade de amostra determinada para o fator de diluição (FD) conveniente, utilizando pipeta PDP;
- d) adicione a respectiva quantidade de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., utilizando dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,1 mL);
- e) tampe o tubo de ensaio;
- f) agite em velocidade máxima no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 1 min ± 5 segundos;
- g) prossiga com a determinação de ácidos graxos livres, seguindo as etapas do item 6; e,
- h) do resultado obtido, multiplique pelo fator de diluição correspondente.

7.2 Exemplos de diluições

A seguir, alguns exemplos de diluições:

- a) FD = 11,5:

200 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.:

$$FD = \frac{(2,1 + 0,2)}{0,2} = 11,5$$

- b) FD = 15:

150 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

- c) FD = 22:

100 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

8 Notas

- a) o valor de r deve ser da ordem de 0,99. Caso isso não ocorra, repita a curva de calibração;
- b) as diferenças preditas (%) devem ser mínimos, sendo desejável valores inferiores a 10%;
- c) ao se optar por excluir um dos pontos da reta, o valor da absorbância do ponto excluído deve estar próximo ao valor real, quando calculado pela equação da nova curva de calibração, partindo do valor de concentração; e,
- d) apesar de não ser recomendável, é possível utilizar a última curva de calibração construída, armazenada no *software*. Para isso, aperte o botão “STAT” e selecione, com as setas \uparrow ou \downarrow , o *kit* AciSafe™ MSA. Em seguida, faça a leitura do tubo branco e das amostras analisadas.

9 Resultados do trabalho

Na expressão dos resultados, o valor obtido pelo *kit* AciSafe™ MSA deve ser multiplicado por 1,25, em comparação com o método oficial AOCS Ca 5a-40.

APÊNDICE C-1 - Procedimentos de análises com o *kit* PeroxySafe™ STD

Os reagentes, controles e calibradores devem ser mantidos sob refrigeração. Antes do início dos testes, mantenha-os à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos.

1 Reagentes utilizados

- Reagente A PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente B PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente C PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 5 calibradores PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 3 controles STD Diamed F.A.T.S.; e,
- Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

2 Material utilizado

- Analisador Diamed F.A.T.S.;
- Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S.;
- Dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,10 mL);
- Pipeta de repetição Diamed F.A.T.S.;
- Ponteiras de 2,5 mL e de 20-200 µL;
- Pipeta ajustável entre 20 e 200 µL;
- Suporte para dispensador;
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e tampas; e,
- Suporte para tubos de ensaio.

3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.

Após ligado o Analisador Diamed F.A.T.S. (220V), inserido o filtro 570/690 no compartimento de filtro e aquecido por 10 minutos, proceda com a programação para o teste com o *kit* PeroxySafe™ STD.

- a) aperte botão “Option” do equipamento e escolha a opção “*enter / edit protocol*” e, a seguir, “*PeroxySafe STD*”. Entre com os dados da Tabela 1, na seqüência em que vão aparecendo na tela.

Tabela 1. Programação para leituras das análises com o *kit PeroxySafe™ STD*.

Name Protocol	PER.STD
Data reduction	linear regression
Transformation	linear / linear
# of calibrators	3
Calibrator Replicates	1
Calibrator concentration #1	0,05
Calibrator concentration #2	0,2
Calibrator concentration #3	0,5
Correlation Flag	0,99
Units	meq/kg
Normal range Hi	0,55
Normal range Lo	0,01
# of controls	0
# of Rgt Blanks	1
Read mode <> end point	Aperte <i>Enter</i>
Wavelength	570
Rep. %CV Flag	10
Store Protocols	Yes

Peça a impressão das condições do teste, opte pelo botão “yes” após a pergunta “*list protocol?*”.

Para a construção da curva de calibração, aperte o botão “RUN” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit PeroxySafe™ STD* e aperte o botão “*Enter*”. Escolha o número de repetições para cada amostra na opção “*Sample replicates*” e aperte o botão “*Enter*”.

Em seguida, insira o tubo branco (água desmineralizada) quando solicitado (“*insert blank tube*”) para que a leitura seja feita. A seguir, será solicitada a leitura do Reagente Branco (é o calibrador 1).

4 Construção da curva de calibração

- b) enumere 4 tubos de vidro 12 x 75 mm de “C1” a “C5”;
- c) usando a pipeta PDP, transfira 50 μL de cada calibrador nos respectivos tubos;
- d) usando o dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,10 mL) ou pipeta apropriada, transfira 2,10 mL de Reagente A PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- e) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “3” e despeje uma vez (equivalente a 150 μL) do Reagente B PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- f) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “5” e despeje uma vez (equivalente a 250 μL) do Reagente C PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- g) tampe os tubos e agite por inversão no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 15 minutos \pm 30 segundos a 18-25°C, na velocidade 4;
- h) após realizadas as etapas de programação do Analisador Diamed F.A.T.S. e lido o tubo branco (água desmineralizada) e o Reagente Branco, faça a leitura dos calibradores 2 a 5. Deve-se atentar para que o exterior dos tubos esteja bem limpo. Recomenda-se limpá-los com papel higiênico, antes das leituras;
- i) serão impressos os parâmetros da curva (inclinação, interseção e r) e a tabela concentração x absorvância x diferença predita (%);
- j) avaliada a curva de calibração construída (vide item 8), responder “yes” à pergunta “*edit calibrators?*”, caso necessite excluir um ponto, reconsiderar o ponto excluído ou entrar com os dados manualmente, ou “no” para aceitar a curva. Para excluir, com as setas \uparrow ou \downarrow , escolha a opção “*delete a point*” e escolha o ponto referente ao calibrador a ser excluído. Escolha a opção “*continue run*” para prosseguir com as análises.

5 Teste dos controles

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas de *a)* a *f)* do item 4), consecutivamente, para os controles *low*, *medium* and *high*. Enumere 9 tubos, se o teste for

realizado em triplicata, da seguinte forma: “L1” a “L3” (controle *low*); “M1” a “M3” (controle *medium*) e “H1” a “H3” (controle *high*).

Avalie se os controles estão dentro do limite previsto (Tabela 2). Em caso negativo, refaça a curva de calibração e, a seguir, o teste dos controles. Sob determinadas condições, são admitidas diferenças de até 10%, em relação ao limite inferior ou superior da faixa.

Analogamente, se o valor do Coeficiente de Variação dos controles ultrapassar 10%, refaça o teste.

Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de IP para os controles STD.

Controles STD	Faixa esperada (meq/kg)
Low	0,09-0,11
Medium	0,19-0,21
High	0,38-0,42

6 Amostras

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas *a* a *f* (item 4) para as amostras. Opte por letras para discriminar amostras diferentes e números, para a repetição. Por exemplo, o código “B3” equivale à terceira determinação da amostra B.

Note que para valores acima da faixa de concentração calibrada, indicados por “Hi” na impressão, o teste deve ser feito com as amostras diluídas (usando Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.).

Se o valor do Coeficiente de Variação ultrapassar 10%, refaça o teste.

7 Diluições

As diluições devem ser feitas, tendo em vista que a faixa de detecção do *kit* PeroxySafe™ STD é de 0,01 a 0,55 meq/kg.

7.1 Procedimento

- i) em tubo de ensaio, adicione a quantidade de amostra determinada para o fator de diluição (FD) conveniente, utilizando pipeta PDP;
- j) adicione a respectiva quantidade de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., utilizando dispensador FaSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,35 mL);
- k) tampe o tubo de ensaio;
- l) agite em velocidade máxima no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante $1 \text{ min} \pm 5 \text{ segundos}$;
- m) prossiga com a determinação de índice de peróxidos, seguindo as etapas do item 6; e,
- n) do resultado obtido, multiplique pelo fator de diluição correspondente.

7.2 Exemplos de diluições

A seguir, alguns exemplos de diluições:

a. $FD = 11,5$:

200 μL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.:

$$FD = \frac{(2,35 + 0,2)}{0,2} = 12,75$$

b. $FD = 16,67$:

150 μL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

c. $FD = 24,50$:

100 μL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

8 Notas

- a) o valor do Reagente Branco não deve ultrapassar 0,2;
- b) o valor de r deve ser da ordem de 0,99. Caso isso não ocorra, repita a curva de calibração;

- c) as diferenças preditas (%) devem ser mínimos, sendo desejável valores inferiores a 10%;
- d) ao se optar por excluir um dos pontos da reta, o valor da absorbância do ponto excluído deve estar próximo ao valor real, quando calculado pela equação da nova curva de calibração, partindo do valor de concentração; e,
- e) apesar de não ser recomendável, é possível utilizar a última curva de calibração construída, armazenada no *software*. Para isso, aperte o botão “STAT” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit PeroxySafe™ STD*. Em seguida, faça a leitura do tubo branco e das amostras analisadas.

9 Resultados do trabalho

Na expressão dos resultados, o valor obtido pelo *kit PeroxySafe™ STD* deve ser multiplicado por 0,80, em comparação com o método oficial AOCS Cd 8b-90.

APÊNDICE C-2 - Procedimentos de análises com o *kit* PeroxySafe™ HSY

Os reagentes, controles e calibradores devem ser mantidos sob refrigeração. Antes do início dos testes, mantenha-os à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos.

1 Reagentes utilizados

- Reagente A PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente B PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente C PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 5 calibradores PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 3 controles HSY Diamed F.A.T.S.; e,
- Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

2 Material utilizado

- Analisador Diamed F.A.T.S.;
- Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S.;
- Dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,10 mL);
- Pipeta de repetição Diamed F.A.T.S.;
- Pipeta ajustável entre 20 e 200 µL;
- Ponteiras de 2,5 mL e de 20-200 µL;
- Suporte para dispensador;
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e tampas; e,
- Suporte para tubos de ensaio.

3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.

Após ligado o Analisador Diamed F.A.T.S. (220V), inserido o filtro 570/690 no compartimento de filtro e aquecido por 10 minutos, proceda com a programação para o teste PeroxySafe™ HSY.

- a) aperte botão “Option” do equipamento e escolha a opção “*enter / edit protocol*” e, a seguir, “*PeroxySafe HSY*”. Entre com os dados da Tabela 1, na seqüência em que vão aparecendo na tela.

Tabela 1. Programação para leituras das análises com o *kit PeroxySafe™ HSY*.

Name Protocol	PER.HSY
Data reduction	linear regression
Transformation	linear / linear
# of calibrators	4
Calibrator Replicates	1
Calibrator concentration #1	0,025
Calibrator concentration #2	0,05
Calibrator concentration #3	0,1
Calibrator concentration #4	0,2
Correlation Flag	0,99
Units	meq/kg
Normal range Hi	0,22
Normal range Lo	0,01
# of controls	0
# of Rgt Blanks	1
Read mode <> end point	Aperte <i>Enter</i>
Wavelength	570
Rep. %CV Flag	10
Store Protocols	Yes

Peça a impressão das condições do teste, opte pelo botão “yes” após a pergunta “*list protocol?*”.

Para a construção da curva de calibração, aperte o botão “RUN” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit PeroxySafe™ HSY* e aperte o botão “Enter”. Escolha o número de repetições para cada amostra na opção “*Sample replicates*” e aperte o botão “Enter”.

Em seguida, insira o tubo branco (água desmineralizada) quando solicitado (“*insert blank tube*”) para que a leitura seja feita. A seguir, será solicitada a leitura do Reagente Branco (é o calibrador 1).

4 Construção da curva de calibração

- b) enumere 5 tubos de vidro 12 x 75 mm de “C1” a “C5”;
- c) usando a pipeta PDP, transfira 50 μL de cada calibrador nos respectivos tubos;
- d) usando o dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,10 mL) ou pipeta apropriada, transfira 2,10 mL de Reagente A PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- e) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “3” e despeje uma vez (equivalente a 150 μL) do Reagente B PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- f) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “5” e despeje uma vez (equivalente a 250 μL) do Reagente C PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- g) tampe os tubos e agite por inversão no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 15 minutos \pm 30 segundos a 18-25°C, na velocidade 4;
- h) após realizadas as etapas de programação do Analisador Diamed F.A.T.S. e lido o tubo branco (água desmineralizada) e o Reagente Branco, faça a leitura dos calibradores 2 a 5. Deve-se atentar para que o exterior dos tubos esteja bem limpo. Recomenda-se limpá-los com papel higiênico, antes das leituras;
- i) serão impressos os parâmetros da curva (inclinação, interseção e r) e a tabela concentração x absorvância x diferença predita (%);
- j) avaliada a curva de calibração construída (vide item 8), responder “yes” à pergunta “*edit calibrators?*”, caso necessite excluir um ponto, reconsiderar o ponto excluído ou entrar com os dados manualmente, ou “no” para aceitar a curva. Para excluir, com as setas \uparrow ou \downarrow , escolha a opção “*delete a point*” e escolha o ponto referente ao calibrador a ser excluído. Escolha a opção “*continue run*” para prosseguir com as análises.

5 Teste dos controles

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas de *a*) a *f*) do item 4), consecutivamente, para os controles *low*, *medium* and *high*. Enumere 9 tubos, se o teste for

realizado em triplicata, da seguinte forma: “L1” a “L3” (controle *low*); “M1” a “M3” (controle *medium*) e “H1” a “H3” (controle *high*).

Avalie se os controles estão dentro do limite previsto (Tabela 2). Em caso negativo, refaça a curva de calibração e, a seguir, o teste dos controles. Sob determinadas condições, são admitidas diferenças de até 10%, em relação ao limite inferior ou superior da faixa.

Analogamente, se o valor do Coeficiente de Variação dos controles ultrapassar 10%, refaça o teste.

Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de IP para os controles HSY.

Controles HSY	Faixa esperada (meq/kg)
Low	0,03-0,05
Medium	0,07-0,09
High	0,15-0,17

6 Amostras

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas *a* a *f* (item 4) para as amostras. Opte por letras para discriminar amostras diferentes e números, para a repetição. Por exemplo, o código “B3” equivale à terceira determinação da amostra B.

Note que para valores acima da faixa de concentração calibrada, indicados por “Hi” na impressão, o teste deve ser refeito com as amostras diluídas (usando Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.).

Se o valor do Coeficiente de Variação ultrapassar 10%, refaça o teste.

7 Diluições

As diluições devem ser feitas, tendo em vista que a faixa de detecção do *kit* PeroxySafe HSY é de 0,01 a 0,22 meq/kg.

7.1 Procedimento

- a) em tubo de ensaio, adicione a quantidade de amostra determinada para o fator de diluição (FD) conveniente, utilizando pipeta PDP;
- b) adicione a respectiva quantidade de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., utilizando dispensador FaSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,35 mL);
- c) tampe o tubo de ensaio;
- d) agite em velocidade máxima no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante $1 \text{ min} \pm 5 \text{ segundos}$;
- e) prossiga com a determinação de índice de peróxidos, seguindo as etapas do item 6; e,
- f) do resultado obtido, multiplique pelo fator de diluição correspondente.

7.2 Exemplos de diluições

A seguir, alguns exemplos de diluições:

- a) FD = 11,5:

200 μL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.:

$$FD = \frac{(2,35 + 0,2)}{0,2} = 12,75$$

- b) FD = 16,67:

150 μL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

- c) FD = 24,50:

100 μL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

8 Notas

- a) o valor do Reagente Branco não deve ultrapassar 0,2;
- b) o valor de r deve ser da ordem de 0,99. Caso isso não ocorra, repita a curva de calibração;

- c) as diferenças preditas (%) devem ser mínimos, sendo desejável valores inferiores a 10%;
- d) ao se optar por excluir um dos pontos da reta, o valor da absorbância do ponto excluído deve estar próximo ao valor real, quando calculado pela equação da nova curva de calibração, partindo do valor de concentração; e,
- e) apesar de não ser recomendável, é possível utilizar a última curva de calibração construída, armazenada no *software*. Para isso, aperte o botão “STAT” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit* PeroxySafe HSY. Em seguida, faça a leitura do tubo branco e das amostras analisadas.

9 Resultados do trabalho

Na expressão dos resultados, o valor obtido pelo *kit* PeroxySafe™ HSY não necessita de fator de correção, em comparação com o método oficial AOCS Cd 8b-90.

APÊNDICE C-3 - Procedimentos de análises com o *kit* PeroxySafe™ MSA

Os reagentes, controles e calibradores devem ser mantidos sob refrigeração. Antes do início dos testes, mantenha-os à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos.

Os procedimentos aqui descritos são válidos para o óleo já extraído da amostra, conforme descrito em item específico.

1 Reagentes utilizados

- Reagente A PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente B PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente C PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 5 calibradores PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 3 controles MSA Diamed F.A.T.S.; e,
- Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

2 Material utilizado

- Analisador Diamed F.A.T.S.;
- Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S.;
- Dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,10 mL);
- Pipeta de repetição Diamed F.A.T.S.;
- Pipeta ajustável entre 20 e 200 µL;
- Ponteiras de 2,5 mL e de 20-200 µL;
- Suporte para dispensador;
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e tampas; e,
- Suporte para tubos de ensaio.

3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.

Após ligado o Analisador Diamed F.A.T.S. (220V), inserido o filtro 570/690 no compartimento de filtro e aquecido por 10 minutos, proceda com a programação para o teste PeroxySafe™ MSA.

- a) aperte botão “Option” do equipamento e escolha a opção “*enter / edit protocol*” e, a seguir, “*PeroxySafe MSA*”. Entre com os dados da Tabela 1, na seqüência em que vão aparecendo na tela.

Tabela 1. Programação para leituras das análises com o *kit PeroxySafe™ MSA*.

Name Protocol	PER.MSA
Data reduction	linear regression
Transformation	linear / linear
# of calibrators	3
Calibrator Replicates	1
Calibrator concentration #1	0,05
Calibrator concentration #2	0,1
Calibrator concentration #3	0,2
Correlation Flag	0,99
Units	meq/kg
Normal range Hi	0,22
Normal range Lo	0,01
# of controls	0
# of Rgt Blanks	1
Read mode <> end point	Aperte <i>Enter</i>
Wavelength	570
Rep. %CV Flag	10
Store Protocols	Yes

Peça a impressão das condições do teste, opte pelo botão “yes” após a pergunta “*list protocol?*”.

Para a construção da curva de calibração, aperte o botão “RUN” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit PeroxySafe™ MSA* e aperte o botão “Enter”. Escolha o número de repetições para cada amostra na opção “*Sample replicates*” e aperte o botão “Enter”.

Em seguida, insira o tubo branco (água desmineralizada) quando solicitado (“*insert blank tube*”) para que a leitura seja feita. A seguir, será solicitada a leitura do Reagente Branco (é o calibrador 1).

4 Construção da curva de calibração

- b) enumere 5 tubos de vidro 12 x 75 mm de “C1” a “C4”;
- c) usando a pipeta PDP, transfira 100 μL de cada calibrador nos respectivos tubos;
- d) usando o dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,10 mL) ou pipeta apropriada, transfira 2,10 mL de Reagente A PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- e) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “3” e despeje uma vez (equivalente a 150 μL) do Reagente B PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- f) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “5” e despeje uma vez (equivalente a 250 μL) do Reagente C PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- g) tampe os tubos e agite por inversão no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 15 minutos \pm 30 segundos a 18-25°C, na velocidade 4;
- h) após realizadas as etapas de programação do Analisador Diamed F.A.T.S. e lido o tubo branco (água desmineralizada) e o Reagente Branco (calibrador 1), faça a leitura dos calibradores 2 a 4. Deve-se atentar para que o exterior dos tubos esteja bem limpo. Recomenda-se limpá-los com papel higiênico, antes das leituras;
- i) serão impressos os parâmetros da curva (inclinação, interseção e r) e a tabela concentração x absorbância x diferença predita (%);
- j) avaliada a curva de calibração construída (vide item 8), responder “yes” à pergunta “*edit calibrators?*”, caso necessite excluir um ponto, reconsiderar o ponto excluído ou entrar com os dados manualmente, ou “no” para aceitar a curva. Para excluir, com as setas \uparrow ou \downarrow , escolha a opção “*delete a point*” e escolha o ponto referente ao calibrador a ser excluído. Escolha a opção “*continue run*” para prosseguir com as análises.

5 Teste dos controles

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas de *a*) a *f*) do item 4), consecutivamente, para os controles *low*, *medium* and *high*. Enumere 9 tubos, se o teste for realizado em triplicata, da seguinte forma: “L1” a “L3” (controle *low*); “M1” a “M3” (controle *medium*) e “H1” a “H3” (controle *high*).

Avalie se os controles estão dentro do limite previsto (Tabela 2). Em caso negativo, refaça a curva de calibração e, a seguir, o teste dos controles. Sob determinadas condições, são admitidas diferenças de até 10%, em relação ao limite inferior ou superior da faixa.

Analogamente, se o valor do Coeficiente de Variação dos controles ultrapassar 10%, refaça o teste.

Tabela 2. Faixas esperadas dos valores de IP para os controles MSA.

Controles MSA	Faixa esperada (meq/kg)
Low	0,03-0,05
Medium	0,065-0,085
High	0,14-0,16

6 Amostras

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas *a* a *f* (item 4) para as amostras. Opte por letras para discriminar amostras diferentes e números, para a repetição. Por exemplo, o código “B3” equivale à terceira determinação da amostra B.

Note que para valores acima da faixa de concentração calibrada, indicados por “Hi” na impressão, o teste deve ser feito com as amostras diluídas (usando Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.).

Se o valor do Coeficiente de Variação ultrapassar 10%, refaça o teste.

7 Diluições

As diluições devem ser feitas, tendo em vista que a faixa de detecção do *kit* PeroxySafe MSA é de 0,01 a 0,22 meq/kg.

7.1 Procedimento

- em tubo de ensaio, adicione a quantidade de amostra determinada para o fator de diluição (FD) conveniente, utilizando pipeta PDP;
- adicione a respectiva quantidade de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., utilizando dispensador FaSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,35 mL);
- tampe o tubo de ensaio;
- agite em velocidade máxima no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 1 min ± 5 segundos;
- prossiga com a determinação de índice de peróxidos, seguindo as etapas do item 6; e,
- do resultado obtido, multiplique pelo fator de diluição correspondente.

7.2 Exemplos de diluições

A seguir, alguns exemplos de diluições:

- FD = 11,5:

200 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.:

$$FD = \frac{(2,35 + 0,2)}{0,2} = 12,75$$

- FD = 16,67:

150 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

- FD = 24,50:

100 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

8 Notas

- a) o valor do Reagente Branco não deve ultrapassar 0,2;
- b) o valor de r deve ser da ordem de 0,99. Caso isso não ocorra, repita a curva de calibração;
- c) as diferenças preditas (%) devem ser mínimos, sendo desejável valores inferiores a 10%;
- d) ao se optar por excluir um dos pontos da reta, o valor da absorbância do ponto excluído deve estar próximo ao valor real, quando calculado pela equação da nova curva de calibração, partindo do valor de concentração; e,
- e) apesar de não ser recomendável, é possível utilizar a última curva de calibração construída, armazenada no *software*. Para isso, aperte o botão “STAT” e selecione com as setas \uparrow ou \downarrow o *kit* PeroxySafe MSA. Em seguida, faça a leitura do tubo branco e das amostras analisadas.

APÊNDICE D - Procedimentos de análises com o *kit* AlkalSafe™ STD

Os reagentes, controles e calibradores devem ser mantidos sob refrigeração. Antes do início dos testes, mantenha-os à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos.

No caso de matrizes simples e/o complexas, os procedimentos aqui descritos são válidos para o óleo já extraído da amostra, conforme descrito em item específico.

1 Reagentes utilizados

- Reagente A AlkalSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente B AlkalSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 5 calibradores AlkalSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 1 controle AlkalSafe™ STD Diamed F.A.T.S.; e,
- Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

2 Material utilizado

- Analisador Diamed F.A.T.S.;
- Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S.;
- Dispensador AlkalSafe™ Diamed F.A.T.S. (1,9 mL);
- Dispensador AlkalSafe™ Diamed F.A.T.S. (2,5 mL);
- Pipeta de repetição Diamed F.A.T.S.;
- Pipeta ajustável entre 20 e 200 µL;
- Ponteiras de 5,0 mL e de 20-200 µL;
- Suporte para dispensador;
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e tampas; e,
- Suporte para tubos de ensaio.

3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.

Após ligado o Analisador Diamed F.A.T.S. (220V), inserido o filtro 570/690 no compartimento de filtro e aquecido por 10 minutos, proceda com a programação para o teste com o *kit* AlkalSafe™ STD.

- a) aperte botão “Option” do equipamento e escolha a opção “*enter / edit protocol*” e, a seguir, “*AlkalSafe STD*”. Entre com os dados da Tabela 1, na seqüência em que vão aparecendo na tela.

Tabela 1. Programação para leituras das análises com o *kit* AlkalSafe™ STD.

Name Protocol	ALK.STD
Data reduction	linear regression
Transformation	linear / linear
# of calibrators	4
Calibrator Replicates	1
Calibrator concentration #1	8
Calibrator concentration #2	16
Calibrator concentration #3	32
Calibrator concentration #4	64
Correlation Flag	0,99
Units	nmol/mL
Normal range Hi	70
Normal range Lo	7
# of controls	0
# of Rgt Blanks	0
Read mode <> end oiubt	Aperte enter
Wavelength	550
Rep. %CV Flag	10
Store Protocols	yes

Peça a impressão das condições do teste, opte pelo botão “yes” após a pergunta “*list protocol?*”.

Para a construção da curva de calibração, aperte o botão “RUN” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit* AlkalSafe™ STD e aperte o botão “Enter”. Escolha o número de repetições para cada amostra na opção “*Sample replicates*” e aperte o botão “Enter”.

Em seguida, insira o tubo branco (água desmineralizada) quando solicitado (“*insert blank tube*”) para que a leitura seja feita.

4 Construção da curva de calibração

- b) enumere 4 tubos de vidro 12 x 75 mm de “C1” a “C4” e transfira cerca de 2 mL de cada calibrador AlkalSafe™ STD nos tubos apropriados.
- c) após realizadas as etapas de programação do Analisador Diamed F.A.T.S. e lido o tubo branco (água desmineralizada), faça a leitura dos calibradores 1 a 4. Deve-se atentar para que o exterior dos tubos esteja bem limpo. Recomenda-se limpá-los com papel higiênico, antes das leituras;
- d) serão impressos os parâmetros da curva (inclinação, interseção e r) e a tabela concentração x absorbância x diferença predita (%);
- e) avaliada a curva de calibração construída (vide item 8), responder “yes” à pergunta “*edit calibrators?*”, caso necessite excluir um ponto, reconsiderar o ponto excluído ou entrar com os dados manualmente, ou “no” para aceitar a curva. Para excluir, com as setas ↑ ou ↓, escolha a opção “*delete a point*” e escolha o ponto referente ao calibrador a ser excluído. Escolha a opção “*continue run*” para prosseguir com as análises.

5 Teste do controle

- a) enumere 3 tubos de vidro 12 x 75 mm de “C1” a “C3”, se análise for em triplicata;
- b) usando a pipeta PDP, transfira 150 µL de cada calibrador nos respectivos tubos;
- c) usando o dispensador AlkalSafe™ Diamed F.A.T.S. ou pipeta apropriada, transfira 1,9 mL de Reagente A AlkalSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- d) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “3” e despeje duas vezes (equivalente a 600 µL) do Reagente B AlkalSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- e) tampe os tubos e agite por inversão no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 20 minutos ± 30 segundos a 18-25°C, na velocidade 4;
- f) faça a leitura dos tubos;

- g) avalie se o controle está na faixa de 14 a 18 nmol/mL. Em caso negativo, refaça a curva de calibração e, a seguir, repita o teste do controle.

6 Amostras

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas *a* a *f* (item 4) para as amostras. Opte por letras para discriminar amostras diferentes e números, para a repetição. Por exemplo, o código “B3” equivale à terceira determinação da amostra B.

Note que para valores acima da faixa de concentração calibrada, indicados por “Hi” na impressão, o teste deve ser refeito com as amostras diluídas (usando Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.).

Se o valor do Coeficiente de Variação ultrapassar 10%, refaça o teste.

Para óleos cujas cores não sejam amarelo ou verde, deve-se fazer uma correção para a coloração inerente do óleo. Corrija, subtraindo o valor de concentração obtido ao diluir 150 µL de amostra em 2,5 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., após agitação por 20 minutos na velocidade 4. As correções devem ser feitas para valores de absorbância superiores a 0,010 A.

7 Diluições

As diluições devem ser feitas, tendo em vista que a faixa de detecção do *kit* AlkalSafe™ STD é de 7 a 70 nmol/mL.

7.1 Procedimento

- em tubo de ensaio, adicione a quantidade de amostra determinada para o fator de diluição (FD) conveniente, utilizando pipeta PDP;
- adicione a respectiva quantidade de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., utilizando dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,1 mL);
- tampe o tubo de ensaio;

- d) agite em velocidade máxima no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 1 min ± 5 segundos;
- e) prossiga com a determinação de ácidos graxos livres, seguindo as etapas do item 6; e,
- f) do resultado obtido, multiplique pelo fator de diluição correspondente.

7.2 Exemplos de diluições

A seguir, alguns exemplos de diluições:

- a) FD = 11,5:

200 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.:

$$FD = \frac{(2,1 + 0,2)}{0,2} = 11,5$$

- b) FD = 15:

150 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

- c) FD = 22:

100 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

8 Notas

- a) o valor de r deve ser da ordem de 0,99. Caso isso não ocorra, repita a curva de calibração;
- b) as diferenças preditas (%) devem ser mínimos, sendo desejável valores inferiores a 10%;
- c) ao se optar por excluir um dos pontos da reta, o valor da absorbância do ponto excluído deve estar próximo ao valor real, quando calculado pela equação da nova curva de calibração, partindo do valor de concentração; e,
- d) apesar de não ser recomendável, é possível utilizar a última curva de calibração construída, armazenada no *software*. Para isso, aperte o botão “STAT” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit* AlkalSafe™ STD. Em seguida, faça a leitura do tubo branco e das amostras analisadas.

APÊNDICE E - Procedimentos de análises com o *kit* AldeSafe™ STD

Os reagentes, controles e calibradores devem ser mantidos sob refrigeração. Antes do início dos testes, mantenha-os à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos.

No caso de matrizes simples e/o complexas, os procedimentos aqui descritos são válidos para o óleo já extraído da amostra, conforme descrito em item específico.

1 Reagentes utilizados

- Reagente A AldeSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- Reagente B AldeSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 5 calibradores AldeSafe™ Diamed F.A.T.S.;
- 3 controles STD Diamed F.A.T.S.; e,
- Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

2 Material utilizado

- Analisador Diamed F.A.T.S.;
- Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S.;
- Dispensador AldeSafe™ Diamed F.A.T.S. (1,90 mL);
- Pipeta de repetição Diamed F.A.T.S.;
- Pipeta ajustável entre 20 e 200 µL;
- Ponteiras de 5,0 mL e de 20-200 µL;
- Suporte para dispensador;
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm e tampas; e,
- Suporte para tubos de ensaio.

3 Programação do Analisador Diamed F.A.T.S.

Após ligado o Analisador Diamed F.A.T.S. (220V), inserido o filtro 570/690 no compartimento de filtro e aquecido por 10 minutos, proceda com a programação para o teste com o *kit* AldeSafe™ STD.

- a) aperte botão “Option” do equipamento e escolha a opção “*enter / edit protocol*” e, a seguir, “*AldeSafe STD*”. Entre com os dados da Tabela 1, na seqüência em que vão aparecendo na tela.

Tabela 1. Programação para leituras das análises com o *kit* AldeSafe™ STD.

Name Protocol	ALD.STD
Data reduction	linear regression
Transformation	linear / linear
# of calibrators	5
Calibrator Replicates	1
Calibrator concentration #1	0
Calibrator concentration #2	5
Calibrator concentration #3	10
Calibrator concentration #4	25
Calibrator concentration #5	50
Correlation Flag	0,99
Units	nmol/mL
Normal range Hi	55
Normal range Lo	0
# of controls	0
# of Rgt Blanks	0
Read mode <> end oiubt	Aperte enter
Wavelength	550
Rep. %CV Flag	10
Store Protocols	yes

Peça a impressão das condições do teste, opte pelo botão “yes” após a pergunta “*list protocol?*”.

Para a construção da curva de calibração, aperte o botão “RUN” e selecione com as setas ↑ ou ↓ o *kit* AldeSafe™ STD e aperte o botão “Enter”. Escolha o número de repetições para cada amostra na opção “*Sample replicates*” e aperte o botão “Enter”.

Em seguida, insira o tubo branco (água desmineralizada) quando solicitado (“*insert blank tube*”) para que a leitura seja feita.

4 Construção da curva de calibração

- b) enumere 5 tubos de vidro 12 x 75 mm de “C1” a “C5”;
- c) usando a pipeta PDP, transfira 150 µL de cada calibrador nos respectivos tubos;
- d) usando o dispensador AldeSafe™ Diamed F.A.T.S. ou pipeta apropriada, transfira 1,90 mL de Reagente A AldeSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- e) ajuste o volume da pipeta de repetição Diamed F.A.T.S. na posição “3” e despeje duas vezes (equivalente a 600 µL) do Reagente B AldeSafe™ Diamed F.A.T.S. em cada tubo;
- f) tampe os tubos e agite por inversão no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 90 minutos ± 30 segundos a 18-25°C, na velocidade 4;
- g) após realizadas as etapas de programação do Analisador Diamed F.A.T.S. e lido o tubo branco (água desmineralizada), faça a leitura dos calibradores 1 a 5. Deve-se atentar para que o exterior dos tubos esteja bem limpo. Recomenda-se limpá-los com papel higiênico, antes das leituras;
- h) serão impressos os parâmetros da curva (inclinação, interseção e r) e a tabela concentração x absorvância x diferença predita (%);
- i) avaliada a curva de calibração construída (vide item 8), responder “yes” à pergunta “*edit calibrators?*”, caso necessite excluir um ponto, reconsiderar o ponto excluído ou entrar com os dados manualmente, ou “no” para aceitar a curva. Para excluir, com as setas ↑ ou ↓, escolha a opção “*delete a point*” e escolha o ponto referente ao calibrador a ser excluído. Escolha a opção “*continue run*” para prosseguir com as análises.

5 Teste dos controles

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas de *a*) a *f*) do item 4), consecutivamente, para os controles *low*, *medium* and *high*. Enumere 9 tubos, se o teste for realizado em triplicata, da seguinte forma: “L1” a “L3” (controle *low*); “M1” a “M3” (controle *medium*) e “H1” a “H3” (controle *high*).

Avalie se os controles estão dentro do limite previsto (Tabela 2). Em caso negativo, refaça a curva de calibração e, a seguir, o teste dos controles. Sob determinadas condições, são admitidas diferenças de até 10%, em relação ao limite inferior ou superior da faixa.

Analogamente, se o valor do Coeficiente de Variação dos controles ultrapassar 10%, refaça o teste.

Tabela 2. Faixas esperadas de concentração de malonaldeído, em nmol/mL, para os controles STD.

Controles STD	Faixa esperada (nmol/mL)
Low	8,5-10,5
Medium	17,5-19,5
High	33,0-37,0

6 Amostras

De forma similar ao teste dos calibradores, execute as etapas *a* a *f*) (item 4) para as amostras. Opte por letras para discriminar amostras diferentes e números, para a repetição. Por exemplo, o código “B3” equivale à terceira determinação da amostra B.

Note que para valores acima da faixa de concentração calibrada, indicados por “Hi” na impressão, o teste deve ser refeito com as amostras diluídas (usando Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.).

Se o valor do Coeficiente de Variação ultrapassar 10%, refaça o teste.

Para óleos cujas cores não sejam amarelo ou verde, deve-se fazer uma correção para a coloração inerente do óleo. Corrija, subtraindo o valor de concentração obtido ao diluir 150 µL de amostra em 2,5 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., após agitação por

20 minutos na velocidade 4. As correções devem ser feitas para valores de absorbância superiores a 0,010 A.

7 Diluições

As diluições devem ser feitas, tendo em vista que a faixa de detecção do *kit* AldeSafe™ STD é de 0 a 55 nmol/mL.

7.1 Procedimento

- g) em tubo de ensaio, adicione a quantidade de amostra determinada para o fator de diluição (FD) conveniente, utilizando pipeta PDP;
- h) adicione a respectiva quantidade de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S., utilizando dispensador PeroxySafe™ Diamed F.A.T.S. (2,1 mL);
- i) tampe o tubo de ensaio;
- j) agite em velocidade máxima no Agitador tipo Vortex Diamed F.A.T.S. durante 1 min ± 5 segundos;
- k) prossiga com a determinação de ácidos graxos livres, seguindo as etapas do item 6; e,
- l) do resultado obtido, multiplique pelo fator de diluição correspondente.

7.2 Exemplos de diluições

A seguir, alguns exemplos de diluições:

- a) FD = 11,5:

200 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.:

$$FD = \frac{(2,1 + 0,2)}{0,2} = 11,5$$

- b) FD = 15:

150 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.;

- c) FD = 22:

100 μ L de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação Diamed F.A.T.S.

8 Notas

- a) o valor de r deve ser da ordem de 0,99. Caso isso não ocorra, repita a curva de calibração;
- b) as diferenças preditas (%) devem ser mínimos, sendo desejável valores inferiores a 10%;
- c) ao se optar por excluir um dos pontos da reta, o valor da absorbância do ponto excluído deve estar próximo ao valor real, quando calculado pela equação da nova curva de calibração, partindo do valor de concentração; e,
- d) apesar de não ser recomendável, é possível utilizar a última curva de calibração construída, armazenada no *software*. Para isso, aperte o botão “STAT” e selecione com as setas \uparrow ou \downarrow o kit *AldeSafe STD*. Em seguida, faça a leitura do tubo branco e das amostras analisadas.

APÊNDICE F-1– Resultados experimentais de %AGL de azeites de oliva

1 Reagentes do *kit FaSafe™* STD

- calibradores: números de lote 2006003 / 2007003 / 2008003 / 2009003 / 2010003 (1 a 5, respectivamente) – validade: 11/2003;
- reagente A: números de lote 431000210 – validade: 05/2004;
- reagente B: números de lote 4331001 – validade: 10/2004; e,
- controles: números de lote 08440.02.10 / 08450.02.10 / 08460.02.10 (*low, medium e high*, respectivamente) – validade: 09/2003.

2 Amostras

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit FaSafe™* STD.

Amostra	Descrição	Embalagem	mL	Validade	Lote	Origem	Acidez
1	Azeite de oliva	vidro	500	5/06/08	Lote 0101	Portugal	máx. 1,5%
2	Azeite de oliva	lata	500	03/01/06	Lote 157	Argentina	-
3	Azeite de oliva	lata	500	01/06/05	LT 522B/02	Espanha	máx. 1,5%
4	Azeite de oliva	lata	500	dez/05	Lote 750B/03	Portugal	máx. 1,5%
5	Azeite de oliva	lata	500	fev/03	Lote 658B	-	máx. 2,0%
6	Azeite de oliva	lata	500	nov/05	L 21B	Espanha	máx. 1,5%
7	Azeite de oliva	lata	500	set/04	L 095-01	Portugal	máx. 1,5%
8	Azeite de oliva	lata	500	11/06/00	B061106A	Espanha	-
9	Azeite de oliva	lata	500	25/11/00	-	Espanha	-
10	Azeite de oliva	vidro	500	31/10/97	-	Itália	-
11	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	500	17/02/00	-	Portugal	0,5%
12	Azeite de oliva extra-virgem	lata	500	25/11/00	-	Espanha	-
13	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	500	29/11/04	29A	Espanha	máx. 1,0%
14	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	250	25/06/03	25CR	Itália	-
15	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	250	30/12/03	4367720306A	Espanha	máx. 1,0%
16	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	500	28/02/04	4377823007C	Espanha	máx. 1,0%
17	Azeite de oliva	vidro	250	14/08/04	CO15A	Itália	-

18	extra-virgem Azeite de oliva	lata	200	01/07/04	E576	Argentina	-
19	Azeite de oliva 100% puro e natural	vidro	500	ago/04	OV24A	Itália	-
20	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	500	01/11/04	325	Argentina	-
21	Azeite de oliva	lata	500	mar/06	10	Portugal	máx. 1,5%
22	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	500	jun/04	838/2/345	Portugal	máx. 0,5%
23	Azeite de oliva	vidro	500	fev/04	A342922202A	Espanha	máx. 1,5%
24	Azeite de oliva	lata	500	01/07/05	1206	Portugal	máx. 1,5%
25	Azeite de oliva	lata	500	mai/05	17/B	Espanha	máx. 1,0%

3 Resultados das análises com o *kit*

3.1 Curva de calibração 1 – amostras de 1 a 12

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit* FaSafe™ STD, amostras de 1 a 12.

Conc.	Abs	CV (%)*
0,020	0,759	-
0,280	0,508	-
0,680	0,330	-
1,070	0,267	-
2,120	0,204	-

*valores de CV não apareceram.

Controles

Tabela 3. Teste dos controles STD para a curva de calibração 1.

Controles	Absorbância	Conc. (% ác. oléico)	Media (% ác. oléico)	CV (%)	Referência	Protocolo
<i>low</i>	0,392	0,4955	0,5056	1,7	0,45-0,55	0,5238
	0,385	0,5115				
	0,386	0,5097				
<i>medium</i>	0,296	0,8337	0,8489	1,3	0,85-1	0,8799
	0,292	0,8568				
	0,292	0,8568				
<i>high</i>	0,293	0,8481	1,8198	7,4	1,7-1,9	1,8326
	0,208	1,9683				
	0,216	1,7864				

3.2 Curva de calibração 2 – amostras 13 a 25

Tabela 4. Curva de calibração 2 para o *kit* FaSafe™ STD, amostras 13 a 25.

Conc.	Abs	CV (%)
0,020	0,800	4,0
0,280	0,523	1,0
0,680	0,346	0,6
1,070	0,275	2,1
2,120	0,204	0,7

Teste dos Controles

Tabela 5. Teste dos controles STD para a curva de calibração 2.

Controles	Absorbância	Conc. (% ác. oléico)	Média (% ác. oléico)	CV (%)	Referência	Protocolo
<i>low</i>	0,422	0,4532	0,4933	7,0	0,45-0,55	0,5238
	0,397	0,5142				
	0,398	0,5124				
<i>medium</i>	0,305	0,8514	0,8734	2,2	0,85-1	0,8799
	0,299	0,8863				
	0,300	0,8824				
<i>high</i>	0,214	1,8525	1,8273	2,4	1,7-1,9	1,8326
	0,218	1,7771				
	0,214	1,8525				

3.3 Determinação de AGL através do *kit*: as amostras não foram diluídas.

Tabela 6. Resultados experimentais com o *kit* FaSafe™ STD.

Amostra	Conc. (% ác. oléico)	Média (% ác. oléico)	DP	CV (%)
1	0,2021	0,2083	0,0055	2,6
	0,2123			
	0,2106			
2	0,2156	0,2134	0,0020	0,9
	0,2128			
	0,2117			
3	0,2811	0,2869	0,0074	2,6
	0,2843			
	0,2952			
4	0,3571	0,3608	0,0034	0,9
	0,3615			
	0,3637			
5	0,2702	0,2722	0,0020	0,7
	0,2722			
	0,2741			
6	0,5741	0,5658	0,0197	3,5
	0,5433			
	0,5800			
7	1,1900	1,2325	0,0938	7,6
	1,1675			
	1,3400			

	2,1635			
8	2,0547	2,0106	0,1790	8,9
	1,8137			
	1,5597			
9	1,3796	1,4289	0,1144	8,0
	1,3475			
	0,2467			
10	0,2140	0,2308	0,0164	7,1
	0,2317			
	1,1375			
11	1,0850	1,1200	0,0303	2,7
	1,1375			
	1,8750			
12	1,9061	1,9061	0,0311	1,6
	1,9372			
	0,3753			
13	0,4037	0,3911	0,0145	3,7
	0,3943			
	0,3266			
14	0,3530	0,3400	0,0132	3,9
	0,3403			
	0,4063			
15	0,3957	0,4085	0,0141	3,4
	0,4236			
	0,5360			
16	0,5379	0,5397	0,0048	0,9
	0,5451			
	0,5753			
17	0,5692	0,5739	0,0042	0,7
	0,5773			
	0,7434			
18	0,7511	0,7494	0,0054	0,7
	0,7537			
	0,7640			
19	0,7126	0,7280	0,0313	4,3
	0,7074			
	0,8785			
20	0,8248	0,8492	0,0272	3,2
	0,8443			
	1,1539			
21	1,1473	1,1230	0,0479	4,3
	1,0678			
22	0,3425	0,3449	0,0062	1,8

	0,3520			
	0,3403			
	0,6574			
23	0,6384	0,6529	0,0128	2,0
	0,6628			
	1,1009			
24	1,1804	1,1517	0,0441	3,8
	1,1738			
	0,5142			
25	0,5397	0,5245	0,0134	2,6
	0,5197			

4 Determinação de AGL através da metodologia AOCS Ca 5a – 40

Tabela 7. Resultados experimentais de %AGL pelo método oficial.

Amostra	N	V (mL)	massa (g)	% AGL*	Média*	DP	CV (%)
	0,0918	2,00	28,202	0,1836			
1	0,0918	2,05	28,217	0,1880	0,1841	0,0037	2,0
	0,0918	1,97	28,218	0,1807			
	0,0918	1,90	28,219	0,1743			
2	0,0918	1,85	28,207	0,1698	0,1719	0,0023	1,3
	0,0918	1,87	28,218	0,1715			
	0,0918	3,00	28,209	0,2753			
3	0,0918	3,00	28,208	0,2753	0,2738	0,0026	1,0
	0,0918	2,95	28,201	0,2708			
	0,0918	3,80	28,202	0,3488			
4	0,0918	3,95	28,218	0,3623	0,3563	0,0069	1,9
	0,0918	3,90	28,211	0,3578			
	0,0918	2,72	28,213	0,2495			
5	0,0918	2,80	28,203	0,2570	0,2514	0,0049	2,0
	0,0918	2,70	28,222	0,2476			
	0,0918	6,96	28,205	0,6387			
6	0,0918	6,95	28,223	0,6374	0,6364	0,0029	0,5
	0,0918	6,90	28,211	0,6331			
	0,0918	14,10	28,213	1,2936			
7	0,0918	14,15	28,212	1,2982	1,2971	0,0032	0,2
	0,0918	14,17	28,221	1,2996			
8	0,2417	2,25	7,058	2,1728	2,1736	0,0014	0,1

	0,2417	2,25	7,058	2,1728			
	0,2417	2,25	7,050	2,1753			
	0,2417	1,90	7,054	1,8359			
9	0,2417	1,90	7,051	1,8366	1,8273	0,0155	0,8
	0,2417	1,90	7,157	1,8094			
	0,0951	1,94	28,212	0,1844			
10	0,0951	1,86	28,209	0,1768	0,1806	0,0038	2,1
	0,0951	1,90	28,203	0,1807			
	0,0951	13,37	28,215	1,2708			
11	0,0951	13,30	28,202	1,2648	1,2682	0,0031	0,2
	0,0951	13,35	28,210	1,2691			
	0,2417	2,10	7,059	2,0277			
12	0,2417	2,10	7,052	2,0297	2,0188	0,0172	0,9
	0,2417	2,07	7,058	1,9990			
	0,0953	3,8	28,207	0,3621			
13	0,0953	3,6	28,269	0,3422	0,3582	0,0144	4,0
	0,1003	3,7	28,246	0,3703			
	0,0996	3,6	28,292	0,3574			
14	0,0996	3,7	28,258	0,3678	0,3583	0,0091	2,5
	0,1003	3,5	28,297	0,3497			
	0,0996	4,3	28,295	0,4268			
15	0,0996	4,3	28,203	0,4282	0,4187	0,0154	3,7
	0,1003	4,0	28,208	0,4009			
	0,0996	5,6	28,217	0,5574			
16	0,0996	5,5	28,214	0,5475	0,5453	0,0134	2,5
	0,1003	5,3	28,219	0,5310			
	0,0996	6,2	28,204	0,6174			
17	0,0996	6,1	28,208	0,6074	0,6084	0,0086	1,4
	0,1003	6,0	28,259	0,6003			
	0,0953	8,2	28,201	0,7814			
18	0,0953	8,3	28,221	0,7904	0,7972	0,0201	2,5
	0,1003	8,2	28,274	0,8199			
	0,0996	8,4	28,207	0,8364			
19	0,0996	8,4	28,214	0,8362	0,8282	0,0140	1,7
	0,1003	8,1	28,201	0,8120			
	0,0996	10,1	28,203	1,0059			
20	0,0996	10,1	28,186	1,0064	1,0044	0,0030	0,3
	0,1003	10,0	28,245	1,0009			
	0,0953	13,0	28,217	1,2381			
21	0,0953	13,2	28,357	1,2510	1,2636	0,0336	2,7
	0,1003	13,0	28,236	1,3016			
22	0,0953	3,8	28,233	0,3617	0,3648	0,0053	1,4
	0,0953	3,8	28,231	0,3617			

	0,1003	3,7	28,205	0,3709			
	0,0996	6,7	28,254	0,6660			
23	0,0996	6,8	28,214	0,6770	0,6620	0,0173	2,6
	0,0990	6,5	28,224	0,6430			
	0,0953	14,2	28,217	1,3525			
24	0,0953	14,5	28,215	1,3811	1,3693	0,0150	1,1
	0,0990	13,9	28,240	1,3743			
	0,0953	6,0	28,212	0,5716			
25	0,0953	6,0	28,218	0,5714	0,5690	0,0044	0,8
	0,0990	5,7	28,223	0,5639			

* em % ác. oléico

5 Diferenças entre as metodologias: *kit* FaSafe™ STD x AOCS Ca 5a-40

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de %AGL, obtidos pelo *kit* FaSafe™ STD e pela AOCS.

Amostra	AGL (% ác. oléico) - FaSafe STD	AGL (% ác. oléico) - AOCS	Diferença (%)	Acidez declarada pelo fabricante
	0,2021	0,1836	10,1	
1	0,2123	0,1880	12,9	máx. 1,5%
	0,2106	0,1807	16,5	
	0,2156	0,1743	23,7	
2	0,2128	0,1698	25,4	-
	0,2117	0,1715	23,4	
	0,2811	0,2753	2,1	
3	0,2843	0,2753	3,3	máx. 1,5%
	0,2952	0,2708	9,0	
	0,3571	0,3488	2,4	
4	0,3615	0,3623	-0,2	máx. 1,5%
	0,3637	0,3578	1,6	
	0,2702	0,2495	8,3	
5	0,2722	0,2570	5,9	máx. 2,0%
	0,2741	0,2476	10,7	
	0,5741	0,6387	-10,1	
6	0,5433	0,6374	-14,8	máx. 1,5%
	0,5800	0,6331	-8,4	
	1,1900	1,2936	-8,0	
7	1,1675	1,2982	-10,1	máx. 1,5%
	1,3400	1,2996	3,1	

	2,1635	2,1728	-0,4	
8	2,0547	2,1728	-5,4	-
	1,8137	2,1753	-16,6	
	1,5597	1,8359	-15,0	
9	1,3796	1,8366	-24,9	-
	1,3475	1,8094	-25,5	
	0,2467	0,1844	33,8	
10	0,2140	0,1768	21,0	-
	0,2317	0,1807	28,2	
	1,1375	1,2708	-10,5	
11	1,0850	1,2648	-14,2	0,5%
	1,1375	1,2691	-10,4	
	1,8750	2,0277	-7,5	
12	1,9061	2,0297	-6,1	-
	1,9372	1,9990	-3,1	
	0,3753	0,3621	3,7	
13	0,4037	0,3422	18,0	máx. 1,0%
	0,3943	0,3703	6,5	
	0,3266	0,3574	-8,6	
14	0,3530	0,3678	-4,0	-
	0,3403	0,3497	-2,7	
	0,4063	0,4268	-4,8	
15	0,3957	0,4282	-7,6	máx. 1,0%
	0,4236	0,4009	5,7	
	0,5360	0,5574	-3,8	
16	0,5379	0,5475	-1,8	máx. 1,0%
	0,5451	0,5310	2,7	
	0,5753	0,6174	-6,8	
17	0,5692	0,6074	-6,3	-
	0,5773	0,6003	-3,8	
	0,7434	0,7814	-4,9	
18	0,7511	0,7904	-5,0	-
	0,7537	0,8199	-8,1	
	0,7640	0,8364	-8,7	
19	0,7126	0,8362	-14,8	-
	0,7074	0,8120	-12,9	
	0,8785	1,0059	-12,7	
20	0,8248	1,0064	-18,0	-
	0,8443	1,0009	-15,6	
	1,1539	1,2381	-6,8	
21	1,1473	1,2510	-8,3	máx. 1,5%
	1,0678	1,3016	-18,0	
22	0,3425	0,3617	-5,3	máx. 0,5%

	0,3520	0,3617	-2,7	
	0,3403	0,3709	-8,2	
	0,6574	0,6660	-1,3	
23	0,6384	0,6770	-5,7	máx. 1,5%
	0,6628	0,6430	3,1	
	1,1009	1,3525	-18,6	
24	1,1804	1,3811	-14,5	máx. 1,5%
	1,1738	1,3743	-14,6	
	0,5142	0,5716	-10,0	
25	0,5397	0,5714	-5,6	máx. 1,0%
	0,5197	0,5639	-7,8	

APÊNDICE F-2 – Resultados experimentais de %AGL de óleos brutos e degomados

1 Reagentes do *kit* FaSafe™ STD

- calibradores: números de lote 2006003 / 2007003 / 2008003 / 2009003 / 2010003 (1 a 5, respectivamente) – validade: 10/2004;
- reagente A: números de lote 431000210 – validade: 05/2004;
- reagente B: números de lote 4331001 – validade: 10/2004; e,
- controles: números de lote 08440.02.10 / 08450.02.10 / 08460.02.10 (*low, medium e high*, respectivamente) – validade: 09/2003.

2 Amostras

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit* FaSafe™ STD.

Amostra	Descrição
A	Óleo degomado de canola
B	Óleo degomado de girassol
C	Óleo degomado de milho
D	Óleo degomado de soja
E	Óleo bruto de milho – fornecedor 1
F	Óleo bruto de canola
G	Óleo bruto de soja – fornecedor 1
H	Óleo bruto de soja – fornecedor 2
I	Óleo bruto de soja – fornecedor 3
J	Óleo bruto de milho – fornecedor 2

3 Resultados das análises com o kit

3.1 Curva de calibração 1 – em triplicata

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit* FaSafe™ STD.

Conc. (% ác. Oléico)	Absorb.	CV (%)
0,020	0,826	6,4
0,028	0,512	0,4
0,680	0,342	0,7
1,070	0,278	0,2
2,120	0,204	1,9

Teste dos controles

Tabela 3. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controles	Absorb	Conc. (% ác. Oléico)	Conc. média (% ác. oléico)	CV (%)	Referência
LOW	0,420	0,4345	0,4751	7,4	0,45-0,55
	0,395	0,4954			
	0,395	0,4954			
Medium	0,301	0,8734	0,8906	1,7	0,85-1,00
	0,297	0,8949			
	0,296	0,9036			
High	0,210	1,9809	1,9461	3,1	0,17-0,19
	0,215	1,8764			
	0,210	1,9809			

Como o controle *high* estava fora da faixa predita, foi construída nova curva de calibração.

3.2 Curva de calibração 2 – em triplicata

Tabela 4. Curva de calibração 2 para o *kit* FaSafe™ STD.

Conc. (% ác. Oléico)	Absorb.	CV (%)
0,020	0,800	4,0
0,028	0,523	1,0
0,680	0,346	0,6
1,070	0,275	2,1
2,120	0,204	0,7

Teste dos controles

Tabela 5. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.

Controles	Absorb	Conc. (% ác. Oléico)	média (% ác. oléico)	CV (%)	Referência
Low	0,422	0,4532	0,4933	7,0	0,45-0,55
	0,397	0,5142			
	0,398	0,5124			
Medium	0,305	0,8514	0,8734	2,2	0,85-1,00
	0,299	0,8863			
	0,300	0,8824			
High	0,214	1,8525	1,8273	2,4	0,17-0,19
	0,218	1,7771			
	0,214	1,8525			

3.3 Determinação de AGL através do *kit*

Tabela 6. Resultados experimentais com o *kit* FaSafe™ STD.

Amostra	Conc. (% ac. oléico)	média (% ac. oléico)	DP	CV (%)
A	0,8902	0,8993	0,0082	0,9
	0,9060			
	0,9018			
B	1,4240	1,4268	0,0466	3,3
	1,3817			
	1,4747			

C	0,6248	0,5632	0,0533	9,5
	0,5324			
	0,5324			
D	0,4849	0,5154	0,0501	9,7
	0,5732			
	0,4881			
E	0,4409	0,4592	0,0158	3,4
	0,4691			
	0,4675			
F	1,1009	1,1782	0,0733	6,2
	1,2467			
	1,1870			
G	0,4489	0,4440	0,0043	1,0
	0,4409			
	0,4423			
H	0,3340	0,3361	0,0170	5,1
	0,3202			
	0,3541			
I	0,3499	0,3365	0,0128	3,8
	0,3245			
	0,3350			
J	0,6202	0,6278	0,0067	1,1
	0,6330			
	0,6303			

4 Determinação de AGL através da metodologia AOCS Ca 5a-40

Tabela 7. Resultados experimentais de %AGL pelo método oficial.

Amostra	N	V (mL)	massa (g)	% AGL	média	DP	CV (%)
A	0,1003	11,6	28,240	1,1613	1,1480	0,0159	1,4
	0,1003	11,5	28,213	1,1524			
	0,1003	11,3	28,261	1,1304			
B	0,1003	22,6	28,2000	2,2657	2,2943	0,0284	1,2
	0,1003	23,2	28,2400	2,3225			
	0,1003	22,9	28,2130	2,2947			
C	0,0990	6,0	28,2260	0,5935	0,4023	0,1659	41,2
	0,0990	3,0	28,2220	0,2968			
	0,0990	3,2	28,2190	0,3166			
D	0,1003	9,1	28,2580	0,9104	0,8946	0,0289	3,2
	0,1003	8,6	28,2300	0,8612			

	0,1003	9,1	28,2030	0,9122			
	0,1003	20,5	28,2350	2,0526			
E	0,1003	20,4	28,2330	2,0427	2,0388	0,0162	0,8
	0,1003	20,2	28,257	2,0210			
	0,0990	12,0	28,2270	1,1870			
F	0,0990	2,1	28,2080	0,2079	0,5343	0,5653	105,8
	0,0990	2,1	28,201	0,2079			
	0,0990	2,2	28,2290	0,2176			
G	0,0990	1,7	28,2320	0,1681	0,1748	0,0399	22,9
	0,0990	1,4	28,217	0,1385			
	0,0953	12,4	28,196	1,1816			
H	0,0953	12,15	28,192	1,1579	1,1764	0,0165	1,4
	0,0953	11,87	26,808	1,1897			
	0,0953	14,6	28,218	1,3901			
I	0,0953	14,55	28,217	1,3854	1,3965	0,0153	1,1
	0,0953	14,85	28,216	1,4140			
	0,0953	34,55	28,196	3,2923			
J	0,0953	34,75	28,206	3,3101	3,3039	0,0101	0,3
	0,0953	34,75	28,212	3,3094			

5 Diferenças entre as metodologias: *kit* FaSafe™ STD x AOCS Ca 5a-40

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de %AGL, obtidos pelo *kit* FaSafe™ STD e pela AOCS.

Amostra	FaSafe STD (% ác. oléico)	AOCS (% ác. oléico)	Diferença (%)	AGL permitido* (% ác. oléico)
A	0,8902	1,1613	-23,3	máx. 1,0
	0,9060	1,1524	-21,4	
	0,9018	1,1304	-20,2	
	1,4240	2,2657	-37,1	
B	1,3817	2,3225	-40,5	-
	1,4747	2,2947	-35,7	
	0,6248	0,5935	5,3	
C	0,5324	0,2968	79,4	-
	0,5324	0,3166	68,1	
	0,4849	0,9104	-46,7	
D	0,5732	0,8612	-33,4	máx. 1,0
	0,4881	0,9122	-46,5	
	0,4409	2,0526	-78,5	
E	0,4691	2,0427	-77,0	máx. 6,0
	0,4675	2,0210	-76,9	
F	1,1009	1,1870	-7,3	máx. 2,0
	1,2467	0,2079	499,8	

	1,1870	0,2079	470,9	
	0,4489	0,2176	106,3	
G	0,4409	0,1681	162,2	máx. 2,0
	0,4423	0,1385	219,3	
	0,3340	1,1816	-71,7	
H	0,3202	1,1579	-72,3	máx. 2,0
	0,3541	1,1897	-70,2	
	0,3499	1,3901	-74,8	
I	0,3245	1,3854	-76,6	máx. 2,0
	0,3350	1,4140	-76,3	
	0,6202	3,2923	-81,2	
J	0,6330	3,3101	-80,9	máx. 6,0
	0,6303	3,3094	-81,0	

*Resolução nº 482 (BRASIL, 2000).

APÊNDICE F-3 – Resultados experimentais de %AGL de óleos refinados e azeites de oliva

1 Reagentes do *kit* FaSafe™ HSY

- calibradores: número do lote: 2018004 / 2019004 / 2020004 / 2021004 / 2022004 (1 a 5, respectivamente) – validade: 02/2005;
- reagente A: número do lote: 43000210 – validade: 05/2004;
- reagente B: número do lote: 4331001 – validade: 10/2004;
- controles: número do lote:s 20250.02.10 / 20240.02.10 / 20230.02.10 (*low*, *medium* e *high*, respectivamente) – validade: 08/2003; e,
- reagente de preparação: número do lote: 2036002 – validade: 11/2003.

2 Amostras

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit* FaSafe™ HSY.

Amostra	Descrição	Embalagem	mL	Validade	Lote	Origem	Acidez
1	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	250	jun/03	1169	Itália	máx. 1%
2	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	500	20/09/2004	35/02	Portugal	máx. 1,0%
3	Azeite de oliva 100% puro	vidro	500	15/06/2004	093AR	Itália	-
4	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	250	21/03/2005	32/03	Portugal	máx. 1,0%
5	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	500	Nov/04	130	Portugal	máx. 0,7%
6	Azeite de oliva	lata	500	Feb/06	105/2003	Portugal	-
7	Azeite de oliva	lata	200	Jul/04	16B/3	Portugal	-
8	Azeite de oliva extra-virgem	lata	500	Mai/05	22/A	Espanha	máx. 0,75%
9	Azeite de oliva 100% puro	vidro	500	01/01/05	TM5-01	Itália	máx. 1,1%
10	Azeite de oliva extra-virgem com orégano	vidro	250	Out/03	1293	Itália	máx. 1%
11	Azeite de oliva	lata	500	24/10/2005	24A	Espanha	-
12	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	500	jun/05	L224-28/02VE	Portugal	-
13	Azeite de oliva	lata	500	30/06/2005	lot n° 07/02	Portugal	máx. 1,5%
14	Azeite de oliva + óleo de soja	lata	500	Jun/04	L:315:T	Brasil	-

15	Azeite de oliva + óleo de soja	lata	500	26/06/2004	LO 26 22:16	Brasil	-
16	Óleo de arroz	lata	900	Out/04	-	Brasil	-
17	Óleo de algodão (1)	PET	900	Jul/04	GPR LO 0403 13:31 03	Brasil	-
18	Óleo de algodão (2)	PET	900	Jul/04	GPR LO 0403 13:16 03	Brasil	-
19	Óleo de canola	PET	900	Jul/04	LO 903006	Brasil	-
20	Óleo de canola	PET	900	Jul/04	GPR LO 703 13:31 03	Brasil	-
21	Óleo de canola	PET	900	27/02/2003	LT 2603 (00:21A)	Brasil	-
22	Óleo de girassol	PET	900	10/08/04	L 32 31:11 MK	Brasil	-
23	Óleo de girassol	PET	900	22/09/2004	L 23/09/02 11:00	Argentina	-
24	Óleo de girassol	PET	900	Jul/04	GPR LO 703 04:53 03	Brasil	-
25	Óleo de milho	PET	900	09/03/04	16:11:12	Brasil	-
26	Óleo de milho	PET	900	02/08/04	L 31 15:35 MK	Brasil	-
27	Óleo de milho	PET	900	Jul/04	GPR LO 703 02:55 26	Brasil	-
28	Óleo de milho	PET	900	06/08/04	L 32 00:22 MK	Brasil	-
29	Óleo de soja	PET	900	Ago/04	ORP LO 803 19:31 16	Brasil	-
30	Óleo de soja	PET	900	Jul/04	LUZ LO 703 14:30 05	Brasil	-
31	Óleo de soja	PET	900	10/04/04	LT 0907 (04:42C)	Brasil	-

(1) embalagem 1

(2) embalagem 2

3 Resultados com o *kit FaSafe*TM HSY

3.1 Curvas de calibração

a) Curva de calibração 1: Amostras 1 a 13

Equação: $y = -1,815 x + 0,805$; $r = 0,9990$

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit FaSafe*TM HSY.

Concentração	Absorbância	% dif pred.
0,036	0,734	7,6
0,070	0,685	-5,6
0,127	0,577	-1,1
0,163	0,504	1,7
0,185	0,471	-0,4

Controles

Tabela 3. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 1.

Controles	Absorbância	Conc. (% ác. oléic)	Media (% ác. oléic)	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,726	0,0437	0,0466	5,4	0,04-0,06
	0,717	0,0484			
	0,719	0,0477			
<i>Medium</i>	0,648	0,0867	0,0863	3,2	0,07-0,09
	0,644	0,0889			
	0,654	0,0834			
<i>High</i>	0,520	0,1574	0,1571	0,7	0,15-0,17
	0,522	0,1559			
	0,518	0,1581			

b) Curva de calibração 2: Amostras 14 a 17 e 19 a 21

Equação: $y = -1,778 x + 0,829$; $r = 0,9994$

Tabela 4. Curva de calibração 2 para o *kit* FaSafe™ HSY.

Concentração	Absorbância	% dif pred.
0,036	0,761	4,8
0,070	0,706	-1,4
0,127	0,609	-2,7
0,163	0,537	0,8
0,185	0,498	0,6

Controles

Tabela 5. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 2.

Controles	Absorbância	Conc. (% ác. oléic)	Media (% ác. oléic)	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,740	0,0497	0,0510	2,2	0,04-0,06
	0,737	0,0516			
	0,737	0,0516			
<i>Medium</i>	0,670	0,0891	0,0884	2,2	0,07-0,09
	0,676	0,0862			
	0,669	0,0899			
<i>High</i>	0,545	0,1594	0,1600	1,5	0,15-0,17
	0,539	0,1627			
	0,548	0,1579			

c) Curva de calibração 3: Amostras 18 e 22 a 31

Equação: $y = -1,828 x + 0,825$; $r = 0,9988$

Tabela 6. Curva de calibração 3 para o *kit* FaSafe™ HSY.

Concentração	Absorbância	%dif pred.
0,036	0,759	0,3
0,070	0,693	3,2
0,127	0,602	-4,2
0,163	0,525	0,5
0,185	0,483	1,0

Controles

Tabela 7. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 3.

Controles	Absorbância	Conc. (% ác. oléic)	Media (% ác. oléic)	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,749	0,0415	0,0430	6,5	0,04-0,06
	0,750	0,0412			
	0,740	0,0462			
<i>medium</i>	0,676	0,0813	0,0819	3,4	0,07-0,09
	0,670	0,085			
	0,680	0,0795			
<i>high</i>	0,549	0,1522	0,1502	1,3	0,15-0,17
	0,554	0,1482			
	0,551	0,1501			

3.2 Determinação de AGL através do *kit*

Diluição: 11,5 => 200 µL de amostra + 2,1 mL de Reagente de Preparação.

Tabela 8. Resultados experimentais com o *kit* FaSafe™ HSY.

Amostra	AGL (% ác. oléico)	Diluição	AGL (% ác. oléico)	AGL médio	DP	CV (%)
1	0,0867	11,5	0,9971	0,9288	0,0600	6,5
	0,0769	11,5	0,8844			
	0,0787	11,5	0,9051			
2	0,0525	11,5	0,6038	0,5658	0,0329	5,8
	0,0474	11,5	0,5451			
	0,0477	11,5	0,5486			
3	0,0565	1,0	0,0565	0,0559	0,0006	1,0
	0,0554	1,0	0,0554			
	0,0557	1,0	0,0557			
4	0,0510	11,5	0,5865	0,5934	0,0161	2,7
	0,0506	11,5	0,5819			
	0,0532	11,5	0,6118			

	0,0415	11,5	0,4773			
5	0,0459	11,5	0,5279	0,5041	0,0254	5,0
	0,0441	11,5	0,5072			
	0,0488	11,5	0,5612			
6	0,0528	11,5	0,6072	0,5765	0,0266	4,6
	0,0488	11,5	0,5612			
	0,0379	11,5	0,4359			
7	0,0386	11,5	0,4439	0,4412	0,0046	1,1
	0,0386	11,5	0,4439			
	0,0506	11,5	0,5819			
8	0,0495	11,5	0,5693	0,5735	0,0073	1,3
	0,0495	11,5	0,5693			
	0,0907	1,0	0,0907			
9	0,0849	1,0	0,0849	0,0899	0,0046	5,1
	0,0940	1,0	0,0940			
	0,0721	11,5	0,8292			
10	0,0739	11,5	0,8499	0,8403	0,0104	1,2
	0,0732	11,5	0,8418			
	0,0510	11,5	0,5865			
11	0,0517	11,5	0,5946	0,5792	0,0200	3,5
	0,0484	11,5	0,5566			
	0,0452	11,5	0,5198			
12	0,0474	11,5	0,5451	0,5325	0,0127	2,4
	0,0463	11,5	0,5325			
	0,1107	11,5	1,2731			
13	0,1115	11,5	1,2823	1,2903	0,0224	1,7
	0,1144	11,5	1,3156			
	0,0479	11,5	0,5509			
14	0,0475	11,5	0,5463	0,5493	0,0027	0,5
	0,0479	11,5	0,5509			
	0,0382	11,5	0,4393			
15	0,0341	11,5	0,3922	0,4109	0,0250	6,1
	0,0349	11,5	0,4014			
	0,0698	1,0	0,0698			
16	0,0702	1,0	0,0702	0,0689	0,0019	2,7
	0,0668	1,0	0,0668			
	0,0263	1,0	0,0263			
17	0,0289	1,0	0,0289	0,0280	0,0015	5,4
	0,0289	1,0	0,0289			
	0,0227	1,0	0,0227			
18	0,0213	1,0	0,0213	0,0213	0,0015	6,8
	0,0198	1,0	0,0198			
19	0,0319	1,0	0,0319	0,0323	0,0021	6,4

	0,0345	1,0	0,0345			
	0,0304	1,0	0,0304			
	0,0382	1,0	0,0382			
20	0,0337	1,0	0,0337	0,0369	0,0028	7,6
	0,0389	1,0	0,0389			
	0,0445	1,0	0,0445			
21	0,0423	1,0	0,0423	0,0434	0,0011	2,5
	0,0434	1,0	0,0434			
	0,0394	1,0	0,0394			
22	0,0376	1,0	0,0376	0,0381	0,0012	3,1
	0,0372	1,0	0,0372			
	0,0300	1,0	0,0300			
23	0,0292	1,0	0,0292	0,0288	0,0015	5,2
	0,0271	1,0	0,0271			
	0,0343	1,0	0,0343			
24	0,0376	1,0	0,0376	0,0376	0,0033	8,7
	0,0408	1,0	0,0408			
	0,0361	1,0	0,0361			
25	0,0405	1,0	0,0405	0,0382	0,0022	5,8
	0,0379	1,0	0,0379			
	0,0405	1,0	0,0405			
26	0,0376	1,0	0,0376	0,0401	0,0024	5,9
	0,0423	1,0	0,0423			
	0,039	1,0	0,0390			
27	0,0466	1,0	0,0466	0,0438	0,0042	9,6
	0,0459	1,0	0,0459			
	0,064	1,0	0,0640			
28	0,0658	1,0	0,0658	0,0643	0,0013	2,1
	0,0632	1,0	0,0632			
	0,0253	1,0	0,0253			
29	0,026	1,0	0,0260	0,0267	0,0019	7,1
	0,0289	1,0	0,0289			
	0,0274	1,0	0,0274			
30	0,0227	1,0	0,0227	0,0246	0,0025	10,0
	0,0238	1,0	0,0238			
	0,0329	1,0	0,0329			
31	0,0292	1,0	0,0292	0,0314	0,0019	6,2
	0,0321	1,0	0,0321			

4 AGL pela metodologia AOCS Ca 5a – 40

Tabela 9. Resultados experimentais de %AGL pelo método oficial.

Amostra	N	V (mL)	Amostra (g)	AGL (% ác. oléico)	Média	DP	CV (%)
1	0,0996	10,3	28,259	1,0238	1,0149	0,0126	1,2
	0,0996	10,3	28,211	1,0205			
	0,0936	10,7	28,218	1,0004			
2	0,0996	5,7	28,202	0,5677	0,5702	0,0059	1,0
	0,0996	5,8	28,236	0,5769			
	0,0936	6,1	28,201	0,5660			
3	0,0996	0,9	28,219	0,0896	0,0893	0,0004	0,5
	0,0996	0,9	28,238	0,0895			
	0,0936	1,0	28,219	0,0888			
4	0,0996	6,2	28,257	0,6163	0,6027	0,0163	2,7
	0,0996	6,1	28,215	0,6072			
	0,0936	6,3	28,208	0,5846			
5	0,0953	5,2	28,218	0,4952	0,4986	0,0055	1,1
	0,0953	5,2	28,195	0,4956			
	0,0936	5,4	28,215	0,5050			
6	0,0953	5,9	28,255	0,5612	0,5739	0,0142	2,5
	0,0953	6,0	28,221	0,5714			
	0,0936	6,3	28,213	0,5892			
7	0,0953	3,2	28,198	0,3050	0,2999	0,0049	1,6
	0,0953	3,1	28,214	0,2953			
	0,0936	3,2	28,205	0,2993			
8	0,0953	6,1	28,221	0,5809	0,5884	0,0068	1,1
	0,0953	6,2	28,218	0,5905			
	0,0936	6,4	28,207	0,5940			
9	0,0996	1,3	28,218	0,1294	0,1268	0,0045	3,6
	0,0996	1,3	28,203	0,1295			
	0,0936	1,3	28,208	0,1216			
10	0,0996	9,3	28,203	0,9262	0,8989	0,0310	3,5
	0,0996	9,1	28,236	0,9052			
	0,0936	9,3	28,209	0,8651			
11	0,0953	6,1	28,237	0,5806	0,5852	0,0050	0,9
	0,0953	6,2	28,217	0,5905			
	0,0936	6,3	28,211	0,5845			
12	0,0996	5,3	28,246	0,5270	0,5246	0,0049	0,9
	0,0936	5,3	28,202	0,5278			

	0,0936	5,6	28,217	0,5189			
	0,0936	14,8	28,214	1,3793			
13	0,0936	14,8	28,207	1,3797	1,3874	0,0137	1,0
	0,0936	15,0	28,202	1,4033			
	0,0979	4,05	28,201	0,3965			
14	0,0979	4,05	28,211	0,3963	0,3970	0,0011	0,3
	0,0979	4,07	28,216	0,3982			
	0,0979	2,85	28,205	0,2790			
15	0,0979	2,77	28,207	0,2711	0,2747	0,0040	1,4
	0,0979	2,80	28,208	0,2740			
	0,0476	4,10	56,405	0,0976			
16	0,0476	4,05	56,401	0,0965	0,0968	0,0007	0,7
	0,0476	4,05	56,417	0,0964			
	0,0476	1,35	56,409	0,0321			
17	0,0476	1,45	56,418	0,0345	0,0329	0,0014	4,2
	0,0476	1,35	56,402	0,0322			
	0,0476	1,35	56,405	0,0321			
18	0,0476	1,30	56,413	0,0310	0,0314	0,0007	2,2
	0,0476	1,30	56,400	0,0310			
	0,0476	0,95	56,412	0,0226			
19	0,0476	0,90	56,401	0,0214	0,0218	0,0007	3,1
	0,0476	0,90	56,406	0,0214			
	0,0476	1,55	56,404	0,0369			
20	0,0476	1,52	56,411	0,0362	0,0367	0,0004	1,1
	0,0476	1,55	56,401	0,0369			
	0,0476	2,30	56,412	0,0548			
21	0,0476	2,30	56,411	0,0548	0,0544	0,0007	1,3
	0,0476	2,25	56,415	0,0536			
	0,0476	2,40	56,416	0,0571			
22	0,0476	2,40	56,403	0,0572	0,0572	0,0000	0,0
	0,0476	2,40	56,411	0,0571			
	0,0476	1,35	56,417	0,0321			
23	0,0476	1,30	56,402	0,0310	0,0314	0,0007	2,2
	0,0476	1,30	56,414	0,0310			
	0,0476	1,45	56,415	0,0345			
24	0,0476	1,50	56,409	0,0357	0,0349	0,0007	2,0
	0,0476	1,45	56,401	0,0345			
	0,0476	2,20	56,414	0,0524			
25	0,0476	2,15	56,404	0,0512	0,0516	0,0007	1,3
	0,0476	2,15	56,401	0,0512			

	0,0476	2,80	56,418	0,0667			
26	0,0476	2,90	56,409	0,0691	0,0679	0,0012	1,8
	0,0476	2,85	56,400	0,0679			
	0,0476	2,70	56,409	0,0643			
27	0,0476	2,60	56,401	0,0619	0,0639	0,0018	2,8
	0,0476	2,75	56,404	0,0655			
	0,0476	3,92	56,409	0,0933			
28	0,0476	4,00	56,407	0,0953	0,0940	0,0011	1,2
	0,0476	3,92	56,409	0,0933			
	0,0476	1,20	56,413	0,0286			
29	0,0476	1,21	56,411	0,0288	0,0287	0,0001	0,5
	0,0476	1,20	56,408	0,0286			
	0,0476	1,05	56,412	0,0250			
30	0,0476	1,00	56,408	0,0238	0,0242	0,0007	2,8
	0,0476	1,00	56,408	0,0238			
	0,0476	1,65	56,415	0,0393			
31	0,0476	1,57	56,408	0,0374	0,0379	0,0013	3,3
	0,0476	1,55	56,401	0,0369			

5 Diferenças entre as metodologias: *kit* FaSafe™ STD x AOCS Ca 5a-40

Tabela 10. Tabela comparativa dos resultados experimentais de %AGL, obtidos pelo *kit* FaSafe™ HSY e pela AOCS.

Amostra	% ác. oléico (FaSafe HSY)	% ác. oléico (AOCS Ca 5a-40)	Diferença (%)	Acidez declarada pelo produtor
1	0,9971	1,0238	-2,6	máx. 1,0%
	0,8844	1,0205	-13,3	
	0,9051	1,0004	-9,5	
	0,6038	0,5677	6,4	
2	0,5451	0,5769	-5,5	máx. 1,0%
	0,5486	0,5660	-3,1	
	0,0565	0,0896	-36,9	
3	0,0554	0,0895	-38,1	-
	0,0557	0,0888	-37,3	
	0,5865	0,6163	-4,8	
4	0,5819	0,6072	-4,2	máx. 1,0%
	0,6118	0,5846	4,7	
	0,4773	0,4952	-3,6	
5	0,5279	0,4956	6,5	máx. 0,7%
	0,5072	0,5050	0,4	
	0,5612	0,5612	0,0	
6	0,6072	0,5714	6,3	-
	0,5612	0,5892	-4,7	
7	0,4359	0,3050	42,9	-

	0,4439	0,2953	50,3	
	0,4439	0,2993	48,3	
	0,5819	0,5809	0,2	
8	0,5693	0,5905	-3,6	máx. 0,75%
	0,5693	0,5940	-4,2	
	0,0907	0,1294	-29,9	
9	0,0849	0,1295	-34,4	máx. 1,1%
	0,0940	0,1216	-22,7	
	0,8292	0,9262	-10,5	
10	0,8499	0,9052	-6,1	máx. 1,0%
	0,8418	0,8651	-2,7	
	0,5865	0,5806	1,0	
11	0,5946	0,5905	0,7	-
	0,5566	0,5845	-4,8	
	0,5198	0,5270	-1,4	
12	0,5451	0,5278	3,3	-
	0,5325	0,5189	2,6	
	1,2731	1,3793	-7,7	
13	1,2823	1,3797	-7,1	máx. 1,5%
	1,3156	1,4033	-6,2	
	0,5509	0,3965	38,9	
14	0,5463	0,3963	37,8	-
	0,5509	0,3982	38,3	
	0,4393	0,2790	57,5	
15	0,3922	0,2711	44,6	-
	0,4014	0,2740	46,5	
	0,0698	0,0976	-28,5	
16	0,0702	0,0965	-27,2	máx. permitido de 0,3%*
	0,0668	0,0964	-30,7	
	0,0263	0,0321	-18,2	
17	0,0289	0,0345	-16,3	máx. permitido de 0,3%*
	0,0289	0,0322	-10,1	
	0,0227	0,0321	-29,4	
18	0,0213	0,0310	-31,2	máx. permitido de 0,3%*
	0,0198	0,0310	-36,1	
	0,0319	0,0226	41,0	
19	0,0345	0,0214	61,0	máx. permitido de 0,3%*
	0,0304	0,0214	41,8	
	0,0382	0,0369	3,5	
20	0,0337	0,0362	-6,9	máx. permitido de 0,3%*
	0,0389	0,0369	5,4	
	0,0445	0,0548	-18,7	
21	0,0423	0,0548	-22,8	máx. permitido de 0,3%*
	0,0434	0,0536	-19,0	
	0,0394	0,0571	-31,1	
22	0,0376	0,0572	-34,2	máx. permitido de 0,3%*
	0,0372	0,0571	-34,9	
	0,0300	0,0321	-6,7	
23	0,0292	0,0310	-5,7	máx. permitido de 0,3%*
	0,0271	0,0310	-12,5	
	0,0343	0,0345	-0,7	
24	0,0376	0,0357	5,3	máx. permitido de 0,3%*
	0,0408	0,0345	18,1	
	0,0361	0,0524	-31,1	
25	0,0405	0,0512	7,0	máx. permitido de 0,3%*
	0,0379	0,0512	-26,0	

26	0,0405	0,0667	-39,2	máx. permitido de 0,3%*
	0,0376	0,0691	-45,6	
	0,0423	0,0679	-37,7	
27	0,0390	0,0643	-39,3	máx. permitido de 0,3%*
	0,0466	0,0619	-24,7	
	0,0459	0,0655	-29,9	
28	0,0640	0,0933	-31,4	máx. permitido de 0,3%*
	0,0658	0,0953	-30,9	
	0,0632	0,0933	-32,3	
29	0,0253	0,0286	-11,5	máx. permitido de 0,3%*
	0,0260	0,0288	-9,8	
	0,0289	0,0286	1,1	
30	0,0274	0,0250	9,6	máx. permitido de 0,3%*
	0,0227	0,0238	-4,7	
	0,0238	0,0238	-0,1	
31	0,0329	0,0393	-16,3	máx. permitido de 0,3%*
	0,0292	0,0374	-21,9	
	0,0321	0,0369	-13,0	

*Resolução nº 482 (BRASIL, 2000).

APÊNDICE G-1 – Resultados experimentais de IP de óleos de soja

1 Reagentes do *kit PeroxySafe*TM STD

- calibradores: lote: 2029002 / 2031002 / 2033002 / 2004002 - validade: 11/2003;
- reagente A: lote: 4300004 – validade: 06/2004;
- reagente B: lote: 4301005 – validade: 06/2004;
- reagente C: lote: 430200210 – validade: 05/2004;
- controles: lote: 08440.02.10 / 08450.02.10 / 08460.02.10 – validade: 09/2003; e,
- reagente de preparação: lote: 2036002 – validade: 11/2003.

2 AMOSTRAS

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit PeroxySafe*TM STD.

Amostra	descrição	Embalagem	mL	Validade	Lote	Origem
A	Azeite de oliva ¹	Lata	500	30/06/05	07/02	Portugal
B	Azeite de oliva ¹	Lata	500	12/09/04	L095-01	Portugal
C	Azeite de oliva ¹	vidro	500	05/08/05	Lote 0101	Portugal
D	Azeite de oliva	Lata	500	03/01/06	lote 157	Argentina
E	Azeite de oliva ¹	Lata	500	Fev/05	lote 750 B/03	Portugal
F	Azeite de oliva ¹	Lata	500	Nov/05	L 21B	Espanha
G	Azeite de oliva ¹	Lata	500	Jun/05	LT E522B/02	Espanha
H	Azeite de oliva ²	Lata	500	Fev/05	Lot 658B/03	-
I	Azeite de oliva	Lata	500	Ago/04	L 57 C/3	Portugal
J	Óleo de soja	PET	900	Agp/02	LR 00322 CP	Brasil
K	Óleo de soja	PET	900	24/10/02	LT 2001 (21:31 B)	Brasil
L	Óleo de soja	PET	900	Jan/03	L0 402 18:47	Brasil
M	Óleo de soja	PET	900	09/02/03	L06U 16:41	Brasil
N	Óleo de soja	PET	900	15/03/03	-	Brasil
O	Óleo de soja	PET	900	19/04/03	-	Brasil
P	Óleo de soja	Lata	900	14/03/03	L4F5A	Brasil
Q	Óleo de soja	Lata	900	25/04/03	-	Brasil
R	Óleo de soja	Lata	900	Mai/03	-	Brasil
S	Óleo de soja	Lata	900	05/06/03	L 012-TU 17:02	Brasil
T	Óleo de soja	Lata	900	Dez/03	F201201 22:29	Brasil

¹acidez máxima, de acordo com o fornecedor = 1,5%.

²acidez máxima, de acordo com o fornecedor = 2,0%.

3 Kit PeroxySafe™ STD

3.1 Azeites de oliva

a) Curva de calibração 1 (triplicata)

Equação: $y = 1,098 x - 0,002$; $r = 0,9927$

Reagente Branco = 0,178 (< 0,2 => OK!)

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit* PeroxySafe™ STD, azeites de oliva.

Absorbância	Concentração (% ác. Oléico)
0,076	0,05
0,183	0,20
0,558	0,50

b) Teste com controles

1º teste: controles fora da faixa esperada.

Tabela 3. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorbância	IP (meq/kg)	Média	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,077	0,0718	0,0708	1,3	0,09-0,11
	0,075	0,0700			
	0,075	0,0706			
<i>medium</i>	0,229	0,2103	0,2773	60,6	0,17-0,21
	0,512	0,4685			
	0,166	0,1531			
<i>High</i>	0,383	0,3505	0,4274	34,4	0,37-0,41
	0,653	0,5968			
	0,366	0,3349			

2º teste: embora os controles não estivessem dentro da faixa esperada, as diferenças foram bastante pequenas e optou-se, erroneamente (como foi percebido depois) por prosseguir com o teste das amostras.

Tabela 4. Repetição do teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorbância	IP (meq/kg)	Média	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,249	0,2283	0,1137	87,5	0,09-0,11
	0,520	0,0489			
	0,068	0,0640			
<i>medium</i>	0,135	0,1248	0,1280	2,2	0,17-0,21
	0,141	0,1302			
	0,139	0,1290			
<i>High</i>	0,360	0,3295	0,3363	7,0	0,37-0,41
	0,346	0,3168			
	0,396	0,3626			

c) Amostras

Diluições:

- 10,5 => 200 µL de amostra + 1,9 mL Reagente de Preparação; e,
- 39,0 => 50 µL de amostra + 1,9 mL Reagente de Preparação.

Tabela 5. Resultados experimentais com o *kit* PeroxySafe™ STD, azeites de oliva.

Amostra	IP (meq/kg)	Diluição	IP (meq/kg)	IP médio	DP	CV (%)
A	0,5330	10,5	5,6	5,4	0,3	4,7
	0,5125	10,5	5,4			
	0,4854	10,5	5,1			
B	0,4029	10,5	4,2	4,1	0,1	2,9
	0,3855	10,5	4,0			
	0,3813	10,5	4,0			
C	0,1796	39,0	7,0	6,5	0,5	7,0
	0,1561	39,0	6,1			
	0,1669	39,0	6,5			
D	0,0796	10,5	0,8	0,8	0,0	4,0
	0,0736	10,5	0,8			
	0,0778	10,5	0,8			
E	0,3969	10,5	4,2	4,3	0,4	9,6
	0,3788	10,5	4,0			
	0,4541	10,5	4,8			
F	0,4698	10,5	4,9	5,1	0,2	4,8
	0,4685	10,5	4,9			
	0,5095	10,5	5,3			
G	0,3782	10,5	4,0	4,0	0,2	5,9
	0,3674	10,5	3,9			
	0,4114	10,5	4,3			
H	0,2813	10,5	3,0	2,7	0,2	8,0
	0,2458	10,5	2,6			
	0,2452	10,5	2,6			
I	0,4601	10,5	4,8	4,8	0,1	1,3
	0,4481	10,5	4,7			
	0,4547	10,5	4,8			

3.2 Óleos de soja

a) Curva de calibração 1

Reagente branco = 0,113 (< 0,2 => OK!)

Equação: $y = 0,569 x + 0,003$; $r = 0,9982$

Tabela 6. Curva de calibração 1 para o *kit* PeroxySafe™ STD, óleos de soja vencidos.

Absorbância	Concentração (% ác. Oléico)
0,038	0,05
0,108	0,20
0,291	0,50

b) Teste dos controles

1º teste: valores de CV elevados

Tabela 7. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorbância	IP (meq/kg)	Média	CV (%)	Referência
<i>Low</i>	0,044	0,0707	0,08	16,5	0,09-0,11
	0,047	0,0765			
	0,058	0,0963			
<i>Medium</i>	0,101	0,1718	0,20	22,5	0,17-0,21
	0,102	0,1730			
	0,145	0,2496			
<i>High</i>	0,213	0,3681	0,37	2,6	0,37-0,41
	0,206	0,3565			
	0,217	0,3751			

2º teste: a repetição do teste dos controles gerou valores de CV elevados. Apesar disso, optou-se por analisar as amostras, pois os valores médios estavam dentro da faixa esperada.

Tabela 8. Repetição do teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorbância	IP (meq/kg)	Média	CV (%)	Referência
Low	0,053	0,0870	0,11	46,6	0,09-0,11
	0,049	0,0800			
	0,103	0,1753			
Medium	0,115	0,1962	0,21	12,3	0,17-0,21
	0,118	0,2008			
	0,142	0,2438			

c) Amostras: CV \leq 10,0%

Diluição de 10,5 \Rightarrow 200 μ L de amostra + 1,9 mL de Reagente de Preparação

Tabela 9. Resultados experimentais com o *kit* PeroxySafeTM STD, óleos de soja vencidos.

Amostra	IP (meq/kg)	Diluição	IP (meq/kg)	IP médio	DP	CV (%)
J	0,4900	10,5	5,1	5,2	0,0	0,9
	0,4993	10,5	5,2			
	0,4947	10,5	5,2			
K	0,3878	10,5	4,1	4,2	0,1	2,6
	0,4076	10,5	4,3			
	0,4041	10,5	4,2			
L	0,3100	10,5	3,3	3,3	0,1	2,4
	0,3228	10,5	3,4			
	0,3239	10,5	3,4			
M	0,3495	10,5	3,7	3,7	0,1	2,4
	0,3541	10,5	3,7			
	0,3658	10,5	3,8			
N	0,3843	10,5	4,0	4,0	0,0	0,3
	0,3832	10,5	4,0			
	0,3820	10,5	4,0			
O	0,3600	10,5	3,8	3,6	0,2	4,5
	0,3298	10,5	3,5			
	0,3507	10,5	3,7			
P	0,2914	10,5	3,1	3,0	0,1	2,9
	0,2787	10,5	2,9			
	0,2763	10,5	2,9			
Q	0,3193	10,5	3,4	3,2	0,1	3,3
	0,3007	10,5	3,2			
	0,3030	10,5	3,2			
R	0,3553	10,5	3,7	3,7	0,0	0,8
	0,3530	10,5	3,7			
	0,3495	10,5	3,7			
S	0,1590	10,5	1,7	1,7	0,1	4,6
	0,1683	10,5	1,8			
	0,1520	10,5	1,6			
T	0,1660	10,5	1,7	1,4	0,1	8,0
	0,1265	10,5	1,3			
	0,1323	10,5	1,4			
	0,1474	10,5	1,5			

4 Índice de peróxidos pela metodologia AOCS Cd 8b – 90

4.1 Azeites: $CV \leq 5,0\%$

Tabela 10. Resultados experimentais de IP pelo método oficial, azeites de oliva.

Amostra	N	V (mL)	massa (g)	IP (meq/kg)	IP médio	DP	CV (%)
A	0,0094	1,65	2,001	7,75	7,66	0,14	1,8
	0,0094	1,65	2,008	7,72			
	0,0094	1,60	2,005	7,50			
B	0,0094	1,40	2,035	6,47	6,64	0,15	2,3
	0,0094	1,45	2,026	6,73			
	0,0094	1,45	2,023	6,74			
C	0,0094	2,35	2,025	10,91	11,09	0,23	2,1
	0,0094	2,45	2,091	11,01			
	0,0094	2,45	2,030	11,34			
D	0,0094	1,15	5,010	2,16	2,12	0,06	2,7
	0,0094	1,10	5,029	2,06			
	0,0094	1,15	5,030	2,15			
E	0,0094	1,20	2,008	5,62	5,61	0,21	3,7
	0,0094	1,25	2,021	5,81			
	0,0094	1,15	2,002	5,40			
F	0,0094	1,75	2,034	8,09	8,54	0,39	4,6
	0,0094	1,90	2,038	8,76			
	0,0094	1,90	2,039	8,76			
G	0,0094	1,05	2,053	4,81	4,76	0,14	3,0
	0,0094	1,00	2,041	4,61			
	0,0094	1,00	2,009	4,68			
H	0,0094	1,05	2,002	4,93	2,29	0,11	5,0
	0,0094	0,50	2,001	2,35			
	0,0094	0,45	2,000	2,12			
I	0,0094	0,45	2,011	2,34	8,59	0,31	3,6
	0,0094	0,50	2,004	2,35			
	0,0094	1,80	2,034	8,32			
I	0,0094	1,85	2,041	8,52	8,59	0,31	3,6
	0,0094	1,95	2,053	8,93			

4.2 Óleos de soja vencidos

Tabela 11. Resultados experimentais de IP pelo método oficial, óleos de soja vencidos.

Amostra	N	V (mL)	massa (g)	IP (meq/kg)	IP médio	DP	CV (%)
J	0,0095	2,05	5,010	3,9	3,9	0,0	1,1
	0,0095	2,01	5,008	3,8			
	0,0095	2,05	5,010	3,9			
K	0,0095	2,05	5,016	3,9	3,9	0,0	0,6
	0,0095	2,07	5,014	3,9			
	0,0095	2,05	5,013	3,9			
L	0,0095	1,57	5,006	3,0	3,0	0,1	3,2
	0,0095	1,65	5,012	3,1			
	0,0095	1,55	5,003	2,9			
M	0,0095	1,90	5,004	3,6	3,6	0,1	1,5
	0,0095	1,90	5,002	3,6			
	0,0095	1,95	5,007	3,7			
N	0,0095	1,67	5,017	3,2	3,2	0,0	1,0
	0,0095	1,65	5,021	3,1			
	0,0095	1,68	5,015	3,2			
O	0,0095	1,31	5,008	2,5	2,5	0,0	1,5
	0,0095	1,32	5,015	2,5			
	0,0095	1,35	5,014	2,6			
P	0,0095	0,80	5,009	1,5	1,6	0,1	4,4
	0,0095	0,85	5,000	1,6			
	0,0095	0,80	5,008	1,5			
Q	0,0095	0,55	5,005	1,0	1,1	0,1	4,9
	0,0095	0,60	5,012	1,1			
	0,0095	0,60	5,008	1,1			
R	0,0095	0,60	5,012	1,1	1,6	0,0	3,0
	0,0095	0,82	5,003	1,6			
	0,0095	0,80	5,003	1,5			
S	0,0095	0,85	5,006	1,6	1,2	0,1	4,7
	0,0095	0,65	5,006	1,2			
	0,0095	0,60	5,017	1,1			
T	0,0095	0,65	5,010	1,2	0,9	0,0	2,9
	0,0095	0,48	5,007	0,9			
	0,0095	0,50	5,005	0,9			
	0,0095	0,49	5,001	0,9			

5 DIAMED x AOCS: as diferenças entre as metodologias variaram de 2,9 a 192,0%.

Tabela 12. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pelo método oficial.

Amostra	IP (<i>kit</i>)	PV (AOCS)	Diferença (%)	Amostra	IP (<i>kit</i>)	PV (AOCS)	Diferença (%)
A	5,4	7,7	-30,0	K	4,2	3,9	7,7
B	4,1	6,6	-38,4	L	3,3	3,0	11,0
C	6,5	11,1	-41,1	M	3,7	3,6	2,9
D	0,8	2,1	-61,9	N	4,0	3,2	27,5
E	4,3	5,6	-23,3	O	3,6	2,5	44,8
F	5,1	8,5	-40,6	P	3,0	1,6	89,2
G	4,0	4,8	-14,8	Q	3,2	1,1	192,0
H	2,7	2,3	18,2	R	3,7	1,6	136,9
I	4,8	8,6	-44,5	S	1,7	1,2	41,1
J	5,2	3,9	34,5	T	1,4	0,9	52,9

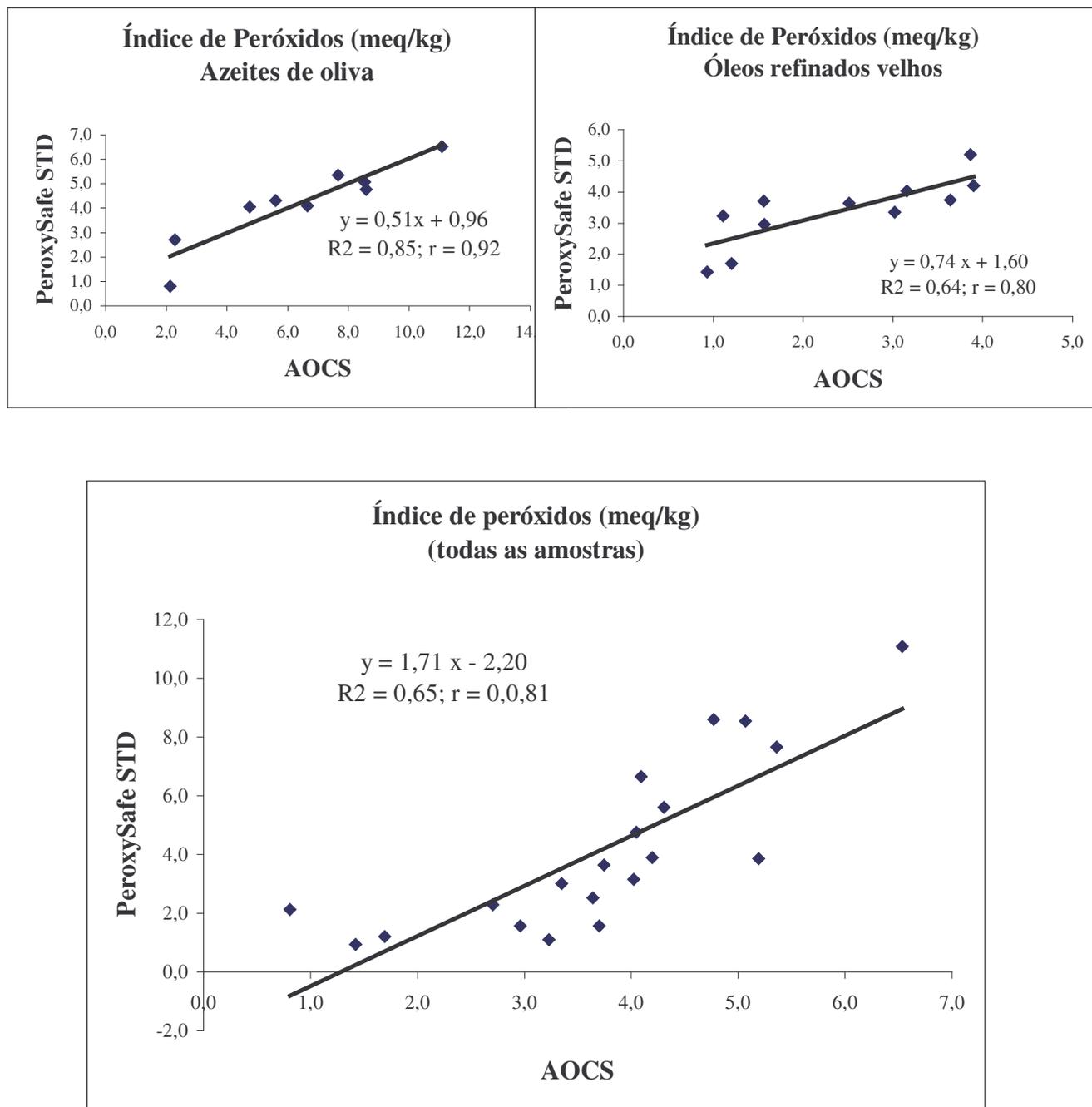


Figura 1. Gráficos de correlação dos resultados obtidos pelo *kit* PeroxySafeTM STD e pela AOCS.

Examinando os valores de coeficiente angular dos gráficos da Figura 1, pode ser observado que o valor obtido para os azeites (0,51) foi diferente do valor obtido para os óleos de sojas (0,74), resultando em um valor completamente inesperado quando se juntou todas as amostras no mesmo gráfico (1,71) e um valor relativamente baixo de R^2 (0,65).

Além disso, o coeficiente linear encontrado (-2,20) estava muito longe do valor esperado (zero), indicando que os erros experimentais foram consideráveis e que a distribuição dos pontos não foi tão satisfatória. Isso levou a conclusão que, nesse caso, não poderiam ter reunidos valores de diferentes curvas de calibração e possivelmente uma delas estava errada.

Reavaliando as curvas de calibração e os testes dos controles, notou-se que a primeira curva (usada para as amostras de azeites) não satisfaz o teste dos controles e foi aceita erroneamente.

A fim de corrigir tal equívoco, como se tinha as medidas de absorbância da curva de calibração 1, para calcular o índice de peróxidos partindo da curva de calibração 2, foi adotado o seguinte procedimento:

- a) construção das curvas de calibração 1 e 2 a partir dos valores de absorbância lidos;
- b) através da regressão linear, foi possível se obter as equações 1 (curva de calibração 1) e 2 (curva de calibração 2);
- c) comparação dos parâmetros da equação da curva de curva de calibração com os respectivos valores gerados pelo *Analyser Diamed*;
- d) cálculo dos valores dos controles através das equações das curvas de calibração e comparação com os valores gerados pelo *Analyser Diamed*;
- e) uma vez concluído que as diferenças entre os valores foram mínimas e insignificantes para os controles, o procedimento foi validado;
- f) cálculo do índice de peróxido dos azeites, a partir da equação 2;
- g) construção da curva de correlação com o método da AOCS com os valores de peróxidos dos azeites, calculados pelas equações 1 e 2;
- h) comparação dos parâmetros da equação da regressão linear; e,

- i) construção da correlação entre metodologias para todas as amostras (azeites e óleos refinados de soja vencidos).

6 CORREÇÕES

6.1 Curvas de calibração

a) Curva de calibração 1 construída:

Curva de calibração construída a partir dos valores de absorvância e concentração lidos: $y = 1,097x - 0,002$; $R^2 = 0,986$ (Figura 2)

Equação obtida pelo Analisador Diamed F.A.T.S.: $y = 1,098x - 0,002$; $r = 0,9927$

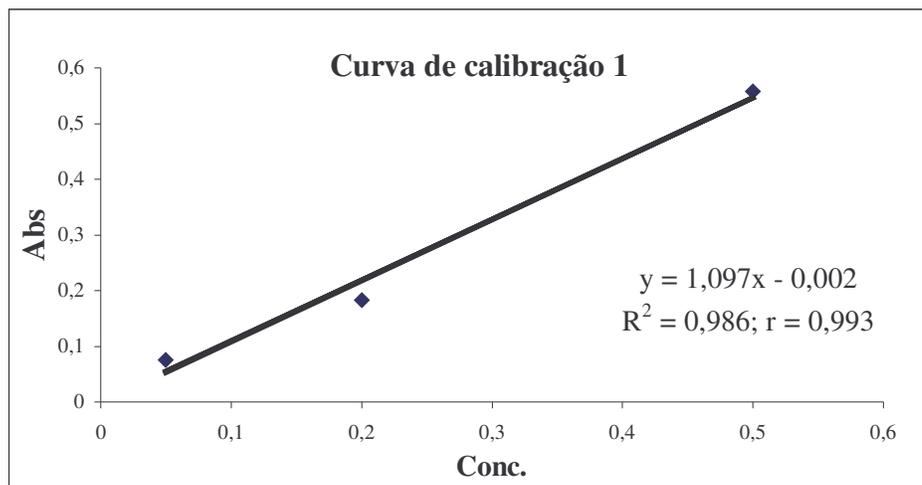


Figura 2. Curva de calibração 1 obtida para os valores de absorvância e concentração lidos.

b) Curva de calibração 2 construída:

Curva de calibração construída a partir dos valores de absorvância e concentração lidos:

$$y = 0,569x + 0,003; R^2 = 0,996 \text{ (ver Figura a seguir)}$$

Equação obtida pelo *Analyser*: $y = 0,569 x + 0,003$; $r = 0,9982$

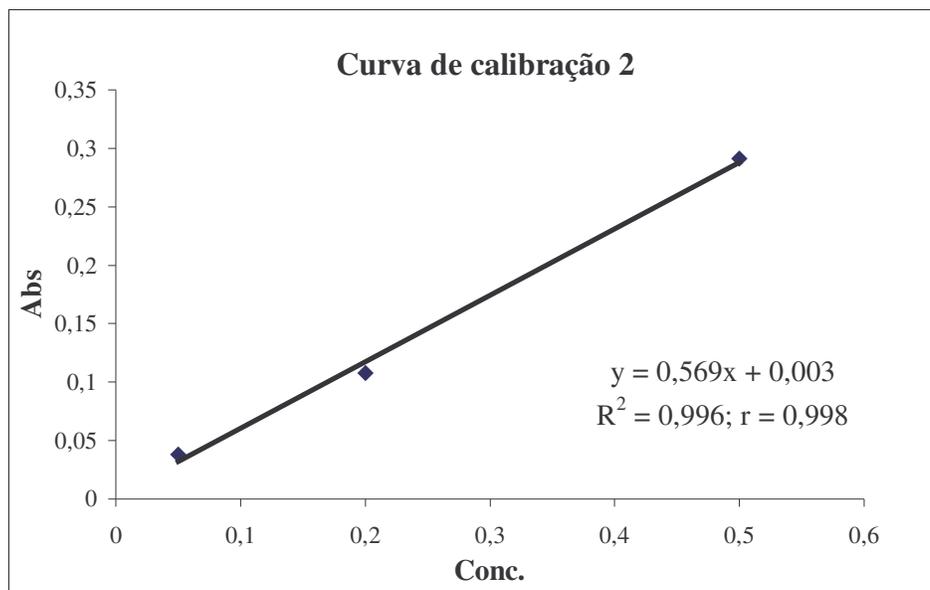


Figura 3. Curva de calibração 2 obtida para os valores de absorbância e concentração lidos.

Para ambas as curvas de calibração, as equações obtidas através de cálculos foram praticamente as mesmas que as respectivas equações dadas pelo Analisador Diamed F.A.T.S. Sendo assim, foi possível calcular os valores de peróxidos, com essas equações.

6.2 TESTE DOS CONTROLES

6.2.1 Curva de calibração 1

a) Teste 1: diferença mínima entre as concentrações calculadas e as concentrações geradas pelo Analisador Diamed F.A.T.S.

Tabela 13. Concentrações calculadas e lidas dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorb	Conc. lida ¹	Media	CV (%)	Conc. Calc. ²	Média	CV (%)	% Diferença
Low	0,077	0,0718			0,0719			
	0,075	0,0700	0,0708	1,3	0,0701	0,0707	1,5	-0,1
	0,075	0,0706			0,0701			
Medium	0,229	0,2103			0,2104			
	0,512	0,4685	0,2773	60,6	0,4681	0,2772	60,6	0,0
	0,166	0,1531			0,1530			
High	0,383	0,3505			0,3506			
	0,653	0,5968	0,4274	34,4	0,5965	0,4274	34,3	0,0
	0,366	0,3349			0,3352			

¹concentração dada pelo *Analyser*

²concentração calculada pela equação 1

b) Teste 2: diferença mínima entre as concentrações calculadas e as concentrações geradas pelo Analisador Diamed F.A.T.S.

Tabela 14. Concentrações calculadas e lidas no segundo teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorb	Conc. lida ¹	Media	CV (%)	Conc. Calc. ²	Média	CV (%)	% Diferença
Low	0,249	0,2283			0,2286			
	0,0520	0,0489	0,1137	87,5	0,0492	0,1138	87,5	0,1
	0,068	0,0640			0,0638			
medium	0,135	0,1248			0,1248			
	0,141	0,1302	0,1280	2,2	0,1302	0,1278	2,2	-0,1
	0,139	0,1290			0,1284			
High	0,360	0,3295			0,3297			
	0,346	0,3168	0,3363	7,0	0,3169	0,3364	7,0	0,0
	0,396	0,3626			0,3625			

¹concentração dada pelo *Analyser*

²concentração calculada pela equação 1

6.2.2 Curva de calibração 2

a) Teste 1:

Tabela 15. Concentrações calculadas e lidas dos controles STD para a Curva de calibração 2.

Controle	Absorb	Conc. lida ¹	Media	CV (%)	Conc. Calc. ²	Média	CV (%)	% Diferença
<i>low</i>	0,044	0,0707	0,08	16,5	0,0721	0,0820	15,8	1,0
	0,047	0,0765			0,0773			
	0,058	0,0963			0,0967			
<i>Medium</i>	0,101	0,1718	0,20	22,5	0,1722	0,1986	22,2	0,2
	0,102	0,1730			0,1740			
	0,145	0,2496			0,2496			
<i>high</i>	0,213	0,3681	0,37	2,6	0,3691	0,3673	2,7	0,2
	0,206	0,3565			0,3568			
	0,217	0,3751			0,3761			

¹concentração dada pelo *Analyser*

²concentração calculada pela equação 2

b) Teste 2:

Tabela 16. Concentrações calculadas e lidas no segundo teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.

Controle	Absorb	Conc. lida ¹	Media	CV (%)	Conc. Calc. ²	Média	CV (%)	% Diferença
<i>low</i>	0,053	0,0870	0,11	46,6	0,0879	0,1148	46,1	0,6
	0,049	0,0800			0,0808			
	0,103	0,1753			0,1757			
<i>medium</i>	0,115	0,1962	0,21	12,3	0,1968	0,2144	12,1	0,4
	0,118	0,2008			0,2021			
	0,142	0,2438			0,2443			

¹concentração dada pelo *Analyser*

²concentração calculada pela equação 2

Como as diferenças foram mínimas, foi confirmado que poderiam ser obtidos os valores de peróxidos a partir da equação 2.

6.2.3 Valores corrigidos de Índice de Peróxidos para os azeites

Tabela 17. Resultados experimentais corrigidos, obtidos pelo *kit PeroxySafe™ STD*.

Amostra	Absorb.	Diluição	IP (meq/kg)	IP médio	DP	CV (%)
A	0,5830	10,5	10,70	10,2	0,5	4,7
	0,5610	10,5	10,30			
	0,5310	10,5	9,74			
	0,4400	10,5	8,06			
B	0,4210	10,5	7,71	7,8	0,2	3,0
	0,4160	10,5	7,62			
	0,1950	39,0	13,16			
C	0,1690	39,0	11,38	12,2	0,9	7,3
	0,1810	39,0	12,20			
	0,0850	10,5	1,51			
D	0,0790	10,5	1,40	1,5	0,1	3,9
	0,0830	10,5	1,48			
	0,4340	10,5	7,95			
E	0,4140	10,5	7,58	8,2	0,8	9,6
	0,4960	10,5	9,10			
	0,5140	10,5	9,43			
F	0,5120	10,5	9,39	9,7	0,5	4,8
	0,5570	10,5	10,22			
	0,4130	10,5	7,57			
G	0,4010	10,5	7,34	7,7	0,5	6,0
	0,4490	10,5	8,23			
	0,3070	10,5	5,61			
H	0,2680	10,5	4,89	5,1	0,4	8,2
	0,2670	10,5	4,87			
	0,5030	10,5	9,23			
I	0,4900	10,5	8,99	9,1	0,1	1,3
	0,4970	10,5	9,12			

6.3 CORRELAÇÃO DiaMed x AOCS

Na Tabela 17 se encontram apenas os valores médios de índice de peróxidos, calculados pelas curvas de calibração 1 e 2, os valores obtidos pela metodologia da AOCS e as diferenças entre métodos.

Tabela 18. Correlação corrigida entre os valores médios de IP, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela AOCS.

Amostra	Média (1)	Média (2)	AOCS	Dif (2) (%)	Amostra	Média (2)	AOCS	Dif (2) (%)
A	5,4	10,2	7,7	33,8	J	5,2	3,9	34,5
B	4,1	7,8	6,6	17,4	K	4,2	3,9	7,7
C	6,0	11,3	11,1	1,7	L	3,3	3,0	11,0
D	0,8	1,5	2,1	-31,0	M	3,7	3,6	2,9
E	4,3	8,2	5,6	46,4	N	4,0	3,2	27,5
F	5,1	9,7	8,5	13,4	O	3,6	2,5	44,8
G	4,0	7,7	4,8	62,2	P	3,0	1,6	89,2
H	2,7	5,1	2,3	124,1	Q	3,2	1,1	192,0
I	4,8	9,1	8,6	6,1	R	3,7	1,6	136,9
					S	1,7	1,2	41,1
					T	1,4	0,9	52,9

- (1) calculado a partir da curva de calibração 1
 (2) calculado a partir da curva de calibração 2

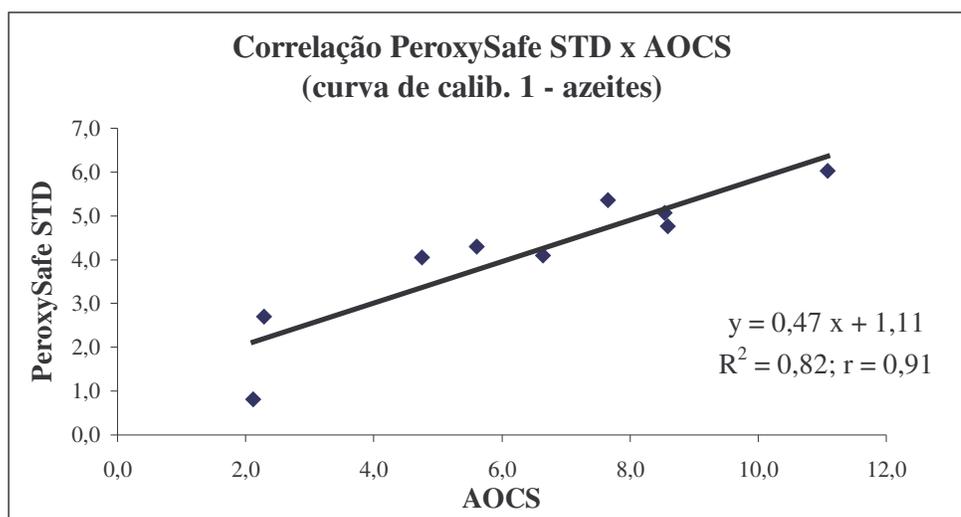


Figura 4. Gráfico da correlação dos valores médios de IP obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela AOCS para as amostras de azeites de oliva, utilizando a Curva de Calibração 1.

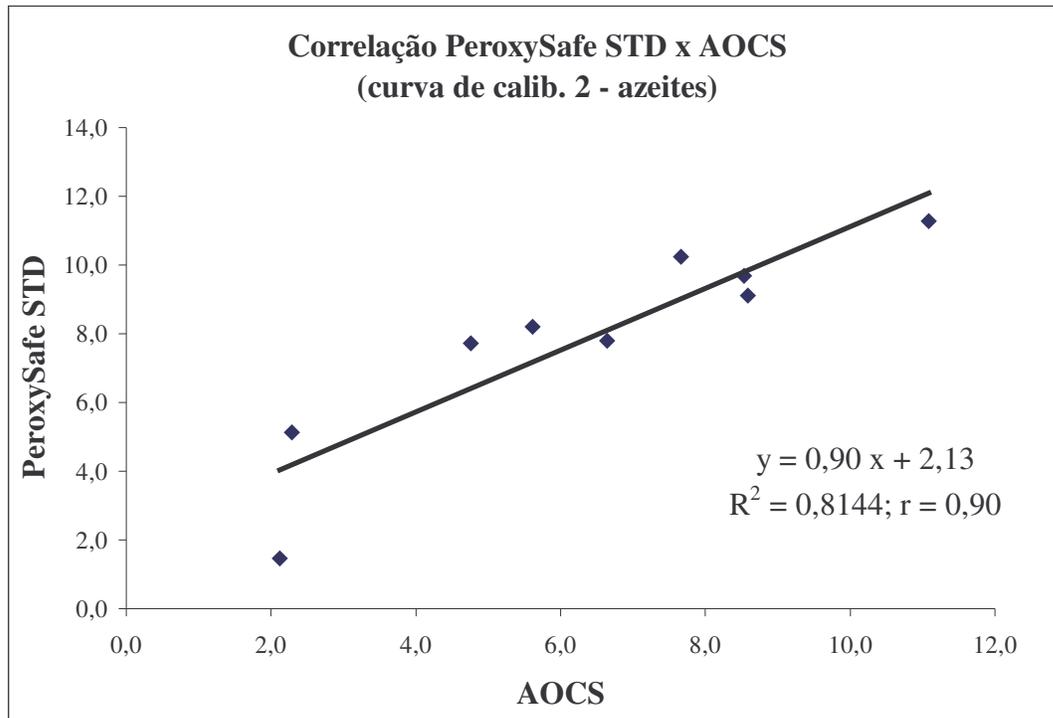


Figura 5. Gráfico da correlação dos valores médios de IP obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela AOCS para as amostras de azeites de oliva, utilizando a Curva de Calibração 1.

Comparando os gráficos das Figuras 4 e 5, o segundo gráfico (curva de calibração 2, Figura 5) gerou melhores resultados, estando mais próximo do esperado: o coeficiente angular do primeiro (0,4738) implicou que os valores da AOCS foram duas vezes superiores aos valores obtidos pelo *kit*, enquanto que para o primeiro gráfico (0,8978), foram quase iguais a unidade, deixando implícito que os valores obtidos pela AOCS e pelo *kit* foram quase os mesmos, considerando os erros experimentais.

Juntando todos os resultados (Figura 6) e considerando todos os dados e não apenas os valores médios, os parâmetros da equação (coeficiente angular = 1,0342 e coeficiente linear = 1,1077) e os valores de R^2 estão mais próximos da realidade.

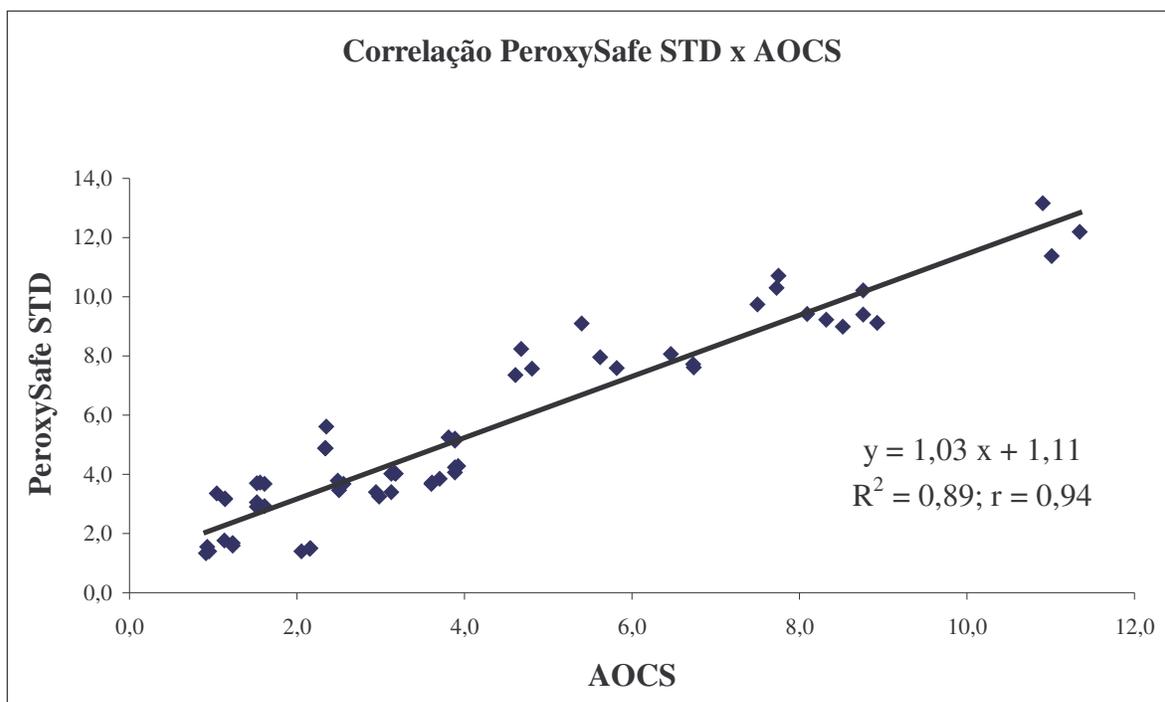


Figura 6. Gráfico da correlação entre os valores de IP médios obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela AOCS para as amostras de azeites de oliva e óleos de soja vencidos.

7 DIFERENÇAS ENTRE AS METODOLOGIAS

Tabela 19. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pela AOCS.

Amostra	IP (meq/kg) - kit	IP (meq/kg) - AOCS	Diferença (%)	V gasto (mL) - AOCS
A	10,7030	7,7511	38,1	1,65
	10,2970	7,7241	33,3	1,65
	9,7434	7,5012	29,9	1,60
	8,0641	6,4668	24,7	1,40
B	7,7135	6,7275	14,7	1,45
	7,6213	6,7375	13,1	1,45
	13,1599	10,9086	20,6	2,35
C	11,3779	11,0139	3,3	2,45
	12,2004	11,3448	7,5	2,45
	1,5132	2,1577	-29,9	1,15
D	1,4025	2,0561	-31,8	1,10
	1,4763	2,1491	-31,3	1,15
	7,9534	5,6175	41,6	1,20
E	7,5844	5,8140	30,5	1,25
	9,0975	5,3996	68,5	1,15
	9,4297	8,0875	16,6	1,75
F	9,3928	8,7635	7,2	1,90
	10,2232	8,7592	16,7	1,90
	7,5659	4,8076	57,4	1,05
G	7,3445	4,6056	59,5	1,00
	8,2302	4,6789	75,9	1,00
	5,6098	2,3488	138,8	0,50
H	4,8902	2,3371	109,2	0,50
	4,8717	2,3453	107,7	0,50
	9,2267	8,3186	10,9	1,80
I	8,9868	8,5203	5,5	1,85
	9,1160	8,9284	2,1	1,95
	5,1450	3,8872	32,4	2,05
J	5,2427	3,8129	37,5	2,01
	5,1944	3,8872	33,6	2,05
	4,0719	3,8826	4,9	2,05
K	4,2798	3,9220	9,1	2,07
	4,2431	3,8849	9,2	2,05
L	3,2550	2,9794	9,2	1,57

	3,3894	3,1275	8,4	1,65
	3,4010	2,9432	15,6	1,55
	3,6698	3,6071	1,7	1,90
M	3,7181	3,6086	3,0	1,90
	3,8409	3,6998	3,8	1,95
	4,0352	3,1622	27,6	1,67
N	4,0236	3,1219	28,9	1,65
	4,0110	3,1825	26,0	1,68
	3,7800	2,4850	52,1	1,31
O	3,4629	2,5005	38,5	1,32
	3,6824	2,5578	44,0	1,35
	3,0597	1,5173	101,7	0,80
P	2,9264	1,6150	81,2	0,85
	2,9012	1,5176	91,2	0,80
	3,3527	1,0440	221,1	0,55
Q	3,1574	1,1373	177,6	0,60
	3,1815	1,1373	179,7	0,60
	3,7307	1,5571	139,6	0,82
R	3,7065	1,5191	144,0	0,80
	3,6698	1,6131	127,5	0,85
	1,6695	1,2335	35,3	0,65
S	1,7672	1,1361	55,5	0,60
	1,5960	1,2325	29,5	0,65
	1,3283	0,9107	45,8	0,48
T	1,3892	0,9491	46,4	0,50
	1,5477	0,9308	66,3	0,49

APÊNDICE G-2 – Resultados experimentais de IP de óleos vegetais refinados

1 Reagentes do *kit PeroxySafe*TM HSY

- calibradores: lote 2029002 / 2030002 / 2031002 / 2032002 / 2033002 (1 a 5, respectivamente) - validade: 11/2003;
- reagente A: lote 4300004 – validade: 06/2004;
- reagente B: lote 4301005 – validade: 06/2004;
- reagente C: lote 430200210 – validade: 05/2004;
- controles: lote 20250.02.10 / 20240.02.10 / 20230.02.10 (*low, medium e high*, respectivamente) – validade: 08/2003; e,
- reagente de preparação: lote 2036002 – validade: 11/2003.

2 AMOSTRAS

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit PeroxySafe*TM HSY.

Amostra	Descrição	Embalagem	Peso ou volume	Validade	Lote
A	Gordura hidrogenada	Plástica	0,5 kg	30/01/2004	-
B	Banha	Plástica	1 kg	26/11/2003	-
C	Gordura hidrogenada	Plástica	0,5 kg	12/01/2004	-
D	Azeite + óleo de soja	Lata	500 mL	jun/04	L:315:T
E	Azeite + óleo de soja	Lata	500 mL	26/6/2004	LO 26 22:16
F	Oleo de arroz	Lata	900 mL	Out/04	-
G	Oleo de algodão (1)	PET	900 mL	Jul/04	GPR LO 0403 13:31 03
H	Oleo de algodão (2)	PET	900 mL	Jul/04	GPR LO 0403 13:16 03
I	Oleo de canola	PET	900 mL	Jul/04	LO 903006
J	Oleo de canola	PET	900 mL	Jul/04	GPR LO 703 13:31 03
K	Oleo de canola	PET	900 mL	27/02/2003	LT 2603(00:21A)
L	Oleo de girassol	PET	900 mL	10/08/2004	L 32 31:11 MK
M	Oleo de girassol	PET	900 mL	22/09/2004	L 23/09/02 11:00
N	Oleo de girassol	PET	900 mL	Jul/04	GPR LO 703 04:53 03
O	Óleo de milho	PET	900 mL	9/03/2004	16:11:12

P	Óleo de milho	PET	900 mL	02/8/2004	L 31 15:35 MK
Q	Óleo de milho	PET	900 mL	Jul/04	GPR LO 703 02:55 26
R	Óleo de soja	PET	900 mL	6/08/2004	L 32 00:22 MK
S	Óleo de soja	PET	900 mL	Ago/04	ORP LO 803 19:31 16
T	Óleo de soja	PET	900 mL	Jul/04	LUZ LO 703 14:30 05
U	Óleo de soja	PET	900 mL	10/04/2004	LT 0907 (04:42C)

3 TESTES COM O *kit*

3.1 Amostras D a G, I a N

a) Teste 1

a.1) Curva de calibração 1

Reagente Branco = 0,100 A

Equação: $y = 0,608 x + 0,003$; $r = 0,9997$

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit* PeroxySafe™ HSY, amostras D a G, I a N.

Absorbância	Concentração (meq/kg)
0,017	0,025
0,034	0,050
0,065	0,100
0,124	0,200

a.2) Teste dos controles: controles fora das faixas esperadas.

Tabela 3. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorb	IP (meq/kg)	IP Médio	CV (%)	Referência
Low	0,034	0,0522	0,0536	2,3	0,03-0,05
	0,036	0,0543			
	0,036	0,0543			
medium	0,0600	0,0946	0,0880	8,9	0,065-0,085
	0,051	0,0793			
	0,580	0,0902			
High	0,116	0,1870	0,1823	4,0	0,14-0,16
	0,108	0,1739			
	0,116	0,1859			

b) Teste 2

b.1) Curva de calibração 2 – Amostras D a G, I a N

Reagente Branco = 0,103 A

Equação: $y = 0,653 x + 0,002$; $r = 0,9995$

Tabela 4. Curva de calibração 2 para o *kit PeroxySafe™* HSY, amostras D a G, I a N.

Absorbância	Concentração (meq/kg)
0,018	0,025
0,033	0,050
0,069	0,100
0,132	0,200

b.2) Teste dos controles: controles dentro das faixas esperadas.

Tabela 5. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 2.

Controle	Absorb	IP (meq/kg)	IP Médio	CV (%)	Referência
<i>Low</i>	0,028	0,0409	0,0409	0,0	0,03-0,05
	0,028	0,0409			
	0,028	0,0409			
<i>medium</i>	0,540	0,0793	0,0786	2,6	0,065-0,085
	0,520	0,0763			
	0,540	0,0803			
<i>high</i>	0,102	0,1542	0,1512	2,9	0,14-0,16
	0,097	0,1461			
	0,102	0,1532			

3.2 Amostras A a C, H, O a U

a) Teste 1

a.1) Curva de calibração 1

Reagente Branco = 0,125 A

Equação: $y = 0,545 x - 0,027$; $r = 0,9991$

Tabela 6. Curva de calibração 1 para o *kit PeroxySafe™* HSY, amostras A a C, H, O a U.

Absorbância	Concentração (meq/kg)
-0,015	0,025
0,000	0,050
0,030	0,100
0,081	0,200

a.2) Teste dos controles: controles fora da faixa esperada.

Tabela 7. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorb	IP (meq/kg)	IP Médio	CV (%)	Referência
<i>low</i>	-0,001	0,0477	0,0481	3,8	0,03-0,05
	0,000	0,0501			
	-0,002	0,0465			
<i>medium</i>	0,021	0,0889	0,0877	3,6	0,065-0,085
	0,022	0,0901			
	0,019	0,0841			
<i>high</i>	0,067	0,1737	0,1709	3,5	0,14-0,16
	0,062	0,1640			
	0,068	0,1750			

b) Teste 2

b.1) Curva de calibração 2 – (Amostras A a C, H, O a U)

Reagente Branco = 0,096 A

Equação: $y = 0,627 x + 0,002$; $r = 1,0000$

Tabela 8. Curva de calibração 2 para o *kit PeroxySafe™* HSY, amostras A a C, H, O a U.

Absorbância	Concentração (meq/kg)
0,017	0,025
0,033	0,050
0,064	0,100
0,127	0,200

b.2) Teste dos controles: controles dentro das faixas esperadas.

Tabela 9. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 2.

Controle	Absorb	IP (meq/kg)	IP Médio	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,026	0,0397	0,0393	4,0	0,03-0,05
	0,025	0,0376			
	0,027	0,0407			
<i>Medium</i>	0,049	0,0756	0,0735	2,5	0,065-0,085
	0,047	0,0724			
	0,047	0,0724			
<i>High</i>	0,090	0,1410	0,1519	6,2	0,14-0,16
	0,100	0,1568			
	0,100	0,1578			

3.3 Determinação de Índice de Peróxidos através do *kit*

Diluições utilizadas:

- 12,8 => 200 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação;
- 34,6 => 70 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação;
- 48,0 => 50 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação; e,
- 51,0 => 38 µL de amostra + 1,90 mL de Reagente de Preparação.

Tabela 10. Resultados experimentais com o *kit* PeroxySafe™ HSY.

Amostra	IP lido (meq/kg)	Diluição	IP (meq/kg)	IP Médio	DP	CV (%)
A	0,0450	51,0	2,3	2,2	0,1	5,0
	0,0407	51,0	2,1			
	0,0428	51,0	2,2			
B	0,1536	51,0	7,8	7,8	0,2	2,4
	0,1568	51,0	8,0			
	0,1494	51,0	7,6			
C	0,0787	51,0	4,0	4,3	0,3	7,0
	0,0903	51,0	4,6			
	0,0829	51,0	4,2			
D	0,1593	34,6	5,5	5,5	0,0	0,6
	0,1613	34,6	5,6			
	0,1603	34,6	5,5			
E	0,2159	12,8	2,8	2,8	0,1	2,6
	0,2220	12,8	2,8			
	0,2109	12,8	2,7			

	0,1674	34,6	5,8			
F	0,1593	34,6	5,5	5,7	0,2	2,8
	0,1674	34,6	5,8			
	0,1147	34,6	4,0			
G	0,1249	34,6	4,3	4,1	0,2	4,3
	0,1198	34,6	4,1			
	0,1156	34,8	4,0			
H	0,1262	34,8	4,4	4,2	0,2	4,4
	0,1220	34,8	4,2			
	0,0996	12,8	1,3			
I	0,1006	12,8	1,3	1,3	0,0	0,6
	0,0996	12,8	1,3			
	0,1077	12,8	1,4			
J	0,1026	12,8	1,3	1,4	0,1	3,8
	0,1107	12,8	1,4			
	0,1097	34,6	3,8			
K	0,1016	34,6	3,5	3,6	0,2	5,2
	0,0996	34,6	3,4			
	0,0854	34,6	3,0			
L	0,0894	34,6	3,1	3,0	0,1	2,3
	0,0874	34,6	3,0			
	0,1967	48,0	9,4			
M	0,1957	48,0	9,4	9,4	0,1	1,1
	0,1927	48,0	9,2			
	0,1309	34,6	4,5			
N	0,1299	34,6	4,5	4,6	0,1	2,0
	0,1350	34,6	4,7			
	0,1051	12,8	1,3			
O	0,0998	12,8	1,3	1,3	0,0	2,7
	0,1009	12,8	1,3			
	0,0882	12,8	1,1			
P	0,0850	12,8	1,1	1,1	0,0	2,1
	0,0882	12,8	1,1			
	0,1251	12,8	1,6			
Q	0,1230	12,8	1,6	1,7	0,1	7,6
	0,1410	12,8	1,8			
	0,1747	12,8	2,2			
R	0,2022	12,8	2,6	2,4	0,2	7,9
	0,1800	12,8	2,3			
	0,1346	12,8	1,7			
S	0,1262	12,8	1,6	1,6	0,1	5,8
	0,1199	12,8	1,5			
	0,1473	12,8	1,9			
T	0,1473	12,8	1,9	1,9	0,0	2,1
	0,1526	12,8	1,9			
	0,1389	12,8	1,8			
U	0,1367	12,8	1,7	1,8	0,1	5,2
	0,1505	12,8	1,9			

4 Índice de Peróxidos através da metodologia AOCS Cd 8b – 90

Tabela 11. Resultados experimentais de IP pelo método oficial.

Amostra	N	V (mL)	massa (g)	IP (meq/kg)	IP Médio	DP	CV (%)
A	0,0093	0,45	5,023	0,83	0,83	0,00	0,3
	0,0093	0,45	5,031	0,83			
	0,0093	0,45	5,048	0,83			
B	0,0093	2,65	5,014	4,92	4,81	0,10	2,0
	0,0093	2,60	5,039	4,80			
	0,0093	2,55	5,018	4,73			
C	0,0093	1,00	5,088	1,83	1,81	0,05	2,8
	0,0093	0,95	5,053	1,75			
	0,0093	1,00	5,053	1,84			
D	0,0093	3,15	5,043	5,81	5,81	0,01	0,2
	0,0093	3,15	5,048	5,80			
	0,0093	3,16	5,041	5,83			
E	0,0093	0,96	5,006	1,78	1,76	0,08	4,4
	0,0093	0,98	5,006	1,82			
	0,0093	0,9	5,004	1,67			
F	0,0093	2,40	5,007	4,46	4,43	0,05	1,2
	0,0093	2,35	4,999	4,37			
	0,0093	2,40	4,999	4,46			
G	0,0093	1,55	5,000	2,88	2,91	0,14	4,8
	0,0093	1,65	5,006	3,07			
	0,0093	1,50	5,002	2,79			
H	0,0093	1,90	5,037	3,51	3,51	0,00	0,1
	0,0093	1,90	5,035	3,51			
	0,0093	1,90	5,043	3,50			
I	0,0093	0,75	5,005	1,39	1,43	0,05	3,8
	0,0093	0,75	5,004	1,39			
	0,0093	0,80	4,999	1,49			
J	0,0093	0,75	4,998	1,40	1,39	0,00	0,1
	0,0093	0,75	5,001	1,39			
	0,0093	0,75	5,003	1,39			
K	0,0093	1,50	5,000	2,79	2,85	0,05	1,8
	0,0093	1,55	5,004	2,88			
L	0,0093	1,55	5,003	2,88	2,62	0,05	2,0
	0,0093	1,40	5,027	2,59			

	0,0093	1,40	5,026	2,59			
	0,0093	1,45	5,027	2,68			
	0,0093	3,75	5,003	6,97			
M	0,0093	3,80	5,009	7,06	7,03	0,05	0,7
	0,0093	3,80	5,009	7,06			
	0,0093	1,40	5,018	2,59			
N	0,0093	1,35	5,012	2,50	2,53	0,05	2,1
	0,0093	1,35	5,020	2,50			
	0,0093	0,65	5,010	1,21			
O	0,0093	0,65	5,060	1,19	1,20	0,01	0,6
	0,0093	0,65	5,014	1,21			
	0,0093	0,55	5,003	1,02			
P	0,0093	0,55	5,009	1,02	1,05	0,05	5,1
	0,0093	0,60	5,005	1,11			
	0,0093	0,70	5,006	1,30			
Q	0,0093	0,75	5,005	1,39	1,36	0,05	4,0
	0,0093	0,75	5,003	1,39			
	0,0093	0,95	5,001	1,77			
R	0,0093	0,95	5,003	1,77	1,80	0,05	2,9
	0,0093	1,00	5,009	1,86			
	0,0093	0,65	5,007	1,21			
S	0,0093	0,60	5,011	1,11	1,15	0,05	4,7
	0,0093	0,60	5,008	1,11			
	0,0093	0,55	5,024	1,02			
T	0,0093	0,60	5,029	1,11	1,08	0,05	4,9
	0,0093	0,60	5,026	1,11			
	0,0093	0,95	5,003	1,77			
U	0,0093	0,95	5,001	1,77	1,74	0,05	3,1
	0,0093	0,90	5,002	1,67			

5 Diferenças entre as metodologias

Tabela 12. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ HSY e pela AOCS.

Amostra	IP (meq/kg) - kit	IP (meq/kg) - AOCS	Diferença (%)	V gasto (mL) - AOCS
A	2,2950	0,8332	175,5	0,45
	2,0757	0,8318	149,5	0,45
	2,1828	0,8290	163,3	0,45
B	7,8336	4,9152	59,4	2,65
	7,9968	4,7986	66,6	2,60
	7,6194	4,7260	61,2	2,55
C	4,0137	1,8278	119,6	1,00
	4,6053	1,7485	163,4	0,95
	4,2279	1,8405	129,7	1,00
D	5,5118	5,8090	-5,1	3,15
	5,5810	5,8033	-3,8	3,15
	5,5464	5,8298	-4,9	3,16
E	2,7635	1,7835	55,0	0,96
	2,8416	1,8206	56,1	0,98
	2,6995	1,6727	61,4	0,90
F	5,7920	4,4578	29,9	2,40
	5,5118	4,3719	26,1	2,35
	5,7920	4,4649	29,7	2,40
G	3,9686	2,8830	37,7	1,55
	4,3215	3,0653	41,0	1,65
	4,1451	2,7889	48,6	1,50
H	4,0229	3,5080	14,7	1,90
	4,3918	3,5094	25,1	1,90
	4,2456	3,5039	21,2	1,90
I	1,2749	1,3936	-8,5	0,75
	1,2877	1,3939	-7,6	0,75
	1,2749	1,4883	-14,3	0,80
J	1,3786	1,3956	-1,2	0,75
	1,3133	1,3947	-5,8	0,75
	1,4170	1,3942	1,6	0,75
K	3,7956	2,7900	36,0	1,50
	3,5154	2,8807	22,0	1,55
	3,4462	2,8813	19,6	1,55
L	2,9548	2,5900	14,1	1,40
	3,0932	2,5905	19,4	1,40
	3,0240	2,6825	12,7	1,45
M	9,4416	6,9708	35,4	3,75
	9,3936	7,0553	33,1	3,80
	9,2496	7,0553	31,1	3,80
N	4,5291	2,5947	74,6	1,40

	4,4945	2,5050	79,4	1,35
	4,6710	2,5010	86,8	1,35
	1,3453	1,2066	11,5	0,65
O	1,2774	1,1947	6,9	0,65
	1,2915	1,2056	7,1	0,65
	1,1290	1,0224	10,4	0,55
P	1,0880	1,0212	6,5	0,55
	1,1290	1,1149	1,3	0,60
	1,6013	1,3004	23,1	0,70
Q	1,5744	1,3936	13,0	0,75
	1,8048	1,3942	29,5	0,75
	2,2362	1,7666	26,6	0,95
R	2,5882	1,7659	46,6	0,95
	2,3040	1,8567	24,1	1,00
	1,7229	1,2073	42,7	0,65
S	1,6154	1,1136	45,1	0,60
	1,5347	1,1142	37,7	0,60
	1,8854	1,0181	85,2	0,55
T	1,8854	1,1096	69,9	0,60
	1,9533	1,1102	75,9	0,60
	1,7779	1,7659	0,7	0,95
U	1,7498	1,7666	-1,0	0,95
	1,9264	1,6733	15,1	0,90

APÊNDICE H-1 – Resultados experimentais de IP de óleos de soja: método modificado

1 Reagentes do *kit* PeroxySafe™ STD

- calibradores: 550202 B / 550204 B / 550206 B / 550005 B (1 a 4, respectivamente)
- validade: 30/10/2004;
- reagente A: 550001 P - lote RD.Br – validade: 30/12/2004;
- reagente B: 550002 P - lote 4301005 – validade: 30/10/2004;
- reagente C: 550003 P - lote RD.Br – validade: 31/12/2004;
- controles: 550015B / 550014B / 550013B (*low*, *medium* e *high*, respectivamente) – validade: 30/12/2004; e,
- reagente de preparação: lote 2036002 – validade: 11/2005.

2 Amostras

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit* PeroxySafe™ STD.

Amostra	Descrição	Embalagem	Volume (mL)	Vencimento	Lote	Acidez	Origem
A	óleo de soja*	lata	900	16/4/2003	L 16 08:54	-	Brasil
B	óleo de soja Soya*	lata	900	jan/03	L0102 18:15	-	Brasil
C	óleo de soja	lata	900	mar/03	-	-	Brasil
D	óleo de soja	lata	900	25/1/2003	-	-	Brasil
E	óleo de soja	lata	900	abr/04	L4F50	-	Brasil
F	óleo de soja	lata	900	mar/03	L011-TU	-	Brasil
G	óleo de soja	PET	900	out/02	L0 102 9:04	-	Brasil
H	óleo de soja	PET	900	mai/03	L0502 17:03	-	Brasil
I	óleo de soja	PET	900	5/2/2003	L06U 14:12	-	Brasil
J	óleo de soja	PET	900	8/5/2003	L 19 16:12 MK2	-	Brasil

K	Azeite de oliva	lata	500	30/6/2005	07/02	máx. 1,5%	Portugal
L	Azeite de oliva	lata	500	12/6/2004	L 095-01	máx. 1,5%	Portugal
M	Azeite de oliva	lata	500	fev/05	750 B	máx. 1,5%	Portugal
N	Azeite de oliva + óleo de soja	lata	500	abr/05	L:210:M	-	-
O	Azeite de oliva	vidro	500	30/11/2005	TM5-10	-	-
P	Azeite de oliva	lata	500	25/11/2000	-	-	Espanha
Q	Azeite de oliva	lata	500	1/8/1999	-	máx. 1,5%	Portugal
R	Azeite de oliva	lata	500	jan/04	167/2004		Argentina
S	Azeite de oliva extra-virgem	vidro	500	17/02/200	-	máx. 0,5%	Portugal
T	Azeite de oliva	vidro	500	31/10/1997	-	-	Itália

*latas abertas 13 dias antes do início das análises.

3 TESTES COM O *kit*

3.1 Curva de calibração 1: amostras A a J

Reagente Branco = 0,084 A

Equação: $y = 0,352 x + 0,006$, $r = 0,9994$

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit* PeroxySafe™ STD, amostras A a J.

Absorb.	Conc. (meq/kg)	Dif. predita (%)
0,022	0,050	-14,1
0,08	0,200	4,4
0,181	0,500	-0,6

Teste dos controles: todos os controles fora

Tabela 3. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorb	IP (meq/kg)	IP Médio	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,052	0,1284	0,1522	45,3	0,09-0,11
	0,087	0,2299			
	0,041	0,0983			
<i>medium</i>	0,08	0,231	0,2303	4,1	0,17-0,21
	0,091	0,2393			
	0,084	0,2205			
<i>high</i>	0,177	0,4856	0,4574	5,5	0,37-0,41
	0,165	0,4499			
	0,160	0,4368			

3.2 Curva de calibração 2: amostras A a J

Reagente Branco = 0,088 A

Equação: $y = 0,384 x + 0,010$, $r = 0,9995$

Tabela 4. Curva de calibração 2 para o *kit* PeroxySafe™ STD, amostras A a J.

Absorb.	Conc. (meq/kg)	Dif. predita (%)
0,027	0,050	-12,1
0,09	0,200	3,9
0,201	0,500	-0,5

Teste dos controles: controle *medium* fora

Tabela 5. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.

Controle	Absorb	IP (meq/kg)	IP Médio	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,043	0,0859	0,0916	5,7	0,09-0,11
	0,047	0,0962			
	0,046	0,0928			
<i>medium</i>	0,097	0,2253	0,2288	1,5	0,17-0,21
	0,099	0,2322			
	0,098	0,2288			
<i>high</i>	0,162	0,3957	0,3825	3,6	0,37-0,41
	0,151	0,3682			
	0,157	0,3837			

3.3 Curva de calibração 3: amostras A a J

Reagente Branco = 0,088 A

Equação: $y = 0,415 x + 0,010$, $r = 0,9999$

Tabela 6. Curva de calibração 3 para o *kit* PeroxySafe™ STD, amostras A a J.

Absorb.	Conc. (meq/kg)	Dif. predita (%)
0,030	0,050	-3,8
0,095	0,200	1,3
0,217	0,500	-0,2

Teste dos controles: controles *medium* e *high* fora da faixa esperada.

Tabela 7. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 3.

Controle	Absorb.	IP (meq/kg)	IP médio	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,044	0,0816	0,0912	24,5	0,09-0,11
	0,042	0,0753			
	0,059	0,1167			
<i>medium</i>	0,108	0,2346	0,2537	19,3	0,17-0,21
	0,100	0,2171			
	0,139	0,3095			
<i>high</i>	0,205	0,4688	0,4306	8,4	0,37-0,41
	0,187	0,4258			
	0,175	0,3971			

Como não foi possível melhorar a curva de calibração (valor de r elevado, 0,9999), os testes das amostras A a J foram feitos com essa curva.

3.4 Curva de calibração 1: amostras K a T

Reagente Branco = 0,084 A

Equação: $y = 0,448 x + 0,005$, $r = 0,9995$

Tabela 8. Curva de calibração 1 para o *kit* PeroxySafe™ STD, amostras K a T.

Absorb.	Conc.	Dif. predita (%)
0,030	0,050	10,2
0,091	0,200	-4,5
0,231	0,500	0,6

Teste dos controles: controles dentro da faixa prevista, embora o valor de CV para o controle *low* esteja relativamente elevado.

Tabela 9. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorb.	IP (meq/kg)	IP médio	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,068	0,1398	0,1195	20,3	0,09-0,11
	0,049	0,0970			
	0,050	0,1000			
	0,069	0,1413			
	0,086	0,1797			
<i>medium</i>	0,108	0,2284	0,2059	10,5	0,17-0,21
	0,127	0,2712			
	0,122	0,2608			
	0,103	0,2180			
	0,094	0,1974			
<i>high</i>	0,161	0,3464	0,3789	10,5	0,37-0,41
	0,170	0,3671			
	0,195	0,4232			
<i>high</i>	0,194	0,4202	0,4128	4,4	0,37-0,41
	0,181	0,3922			
	0,196	0,4261			

3.5 Determinação de Índice de Peróxido, através do *kit*

Diluições utilizadas:

- 12,8 => 200 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação; e,
- 34,6 => 70 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação.

Tabela 10. Resultados experimentais com o *kit* PeroxySafe™ STD.

Amostra	IP (meq/kg)	Diluição	IP (meq/kg)	IP médio	DP	CV (%)
A	0,1024	12,8	1,3056	1,2784	0,0312	2,4
	0,0976	12,8	1,2444			
	0,1008	12,8	1,2852			
B	0,0816	12,8	1,0404	1,1424	0,0935	8,2
	0,096	12,8	1,2240			
	0,0912	12,8	1,1628			
C	0,1884	12,8	2,4021	2,1514	0,2231	10,4
	0,1629	12,8	2,0770			
	0,1549	12,8	1,9750			
D	0,1788	12,8	2,2797	2,3069	0,0312	1,4
	0,1804	12,8	2,3001			
	0,1836	12,8	2,3409			

	0,1709	12,8	2,1790			
E	0,1549	12,8	1,9750	2,0230	0,1384	6,8
	0,1502	12,8	1,9151			
	0,1533	12,8	1,9546			
F	0,1788	12,8	2,2797	2,0970	0,1663	7,9
	0,1613	12,8	2,0566			
	0,1804	12,8	2,3001			
G	0,1868	12,8	2,3817	2,4697	0,2267	9,2
	0,2139	12,8	2,7272			
	0,1278	12,8	1,6295			
H	0,1454	12,8	1,8539	1,7723	0,1241	7,0
	0,1438	12,8	1,8335			
	0,1517	12,8	1,9342			
I	0,147	12,8	1,8743	2,0026	0,1730	8,6
	0,1725	12,8	2,1994			
	0,1294	12,8	1,6499			
J	0,1406	12,8	1,7927	1,7922	0,1422	7,9
	0,1517	12,8	1,9342			
	0,3671	12,8	4,6805			
K	0,4025	12,8	5,1319	4,8374	0,2552	5,3
	0,3686	12,8	4,6997			
	0,3612	12,8	4,6053			
L	0,3376	12,8	4,3044	4,3167	0,2826	6,5
	0,3169	12,8	4,0405			
	0,3567	12,8	4,5479			
M	0,3671	12,8	4,6805	4,6300	0,0717	1,5
	0,3656	12,8	4,6614			
	0,1767	12,8	2,2529			
N	0,218	12,8	2,7795	2,5101	0,2635	10,5
	0,1959	12,8	2,4977			
	0,3686	12,8	4,6997			
O	0,3892	12,8	4,9623	5,0694	0,4333	8,5
	0,435	12,8	5,5463			
	0,1162	12,8	1,4816			
P	0,1088	12,8	1,3872	1,5190	0,1539	10,1
	0,1324	12,8	1,6881			
	0,128	12,8	1,6320			
Q	0,1295	12,8	1,6511	1,6448	0,0110	0,7
	0,1295	12,8	1,6511			
	0,128	12,8	1,6320			
R	0,1221	12,8	1,5568	1,5882	0,0391	2,5
	0,1236	12,8	1,5759			
	0,3508	12,8	4,4727			
S	0,3715	12,8	4,7366	4,6236	0,1360	2,9
	0,3656	12,8	4,6614			
	0,5058	12,8	6,4490			
T	0,494	12,8	6,2985	6,1668	0,3663	5,9
	0,4512	12,8	5,7528			

4 Índice de peróxidos através da metodologia AOCS Cd 8b – 90 modificada

Tabela 11. Resultados experimentais de IP pelo método oficial modificado.

Amostra	N	V (mL)	Massa (g)	IP (meq/kg)	IP Médio	DP	CV (%)
A	0,0047	1,60	5,006	1,1081	1,0870	0,0232	2,1
	0,0047	1,58	5,000	1,0908			
	0,0047	1,55	5,003	1,0622			
B	0,0047	1,30	5,055	0,8207	0,8205	0,0463	5,6
	0,0047	1,35	5,055	0,8668			
	0,0047	1,25	5,058	0,7741			
C	0,0047	2,00	5,018	1,4770	1,5330	0,0736	4,8
	0,0047	2,15	5,018	1,6163			
	0,0047	2,03	5,015	1,5058			
D	0,0047	1,90	5,008	1,3869	1,4342	0,0468	3,3
	0,0047	2,00	5,006	1,4805			
	0,0047	1,95	5,002	1,4351			
E	0,0047	1,81	5,019	1,3002	1,2320	0,0591	4,8
	0,0047	1,70	5,022	1,1974			
	0,0047	1,70	5,018	1,1983			
F	0,0047	1,55	5,010	1,0607	1,0614	0,0463	4,4
	0,0047	1,50	5,003	1,0156			
	0,0047	1,60	5,006	1,1081			
G	0,0047	6,60	5,022	5,7455	5,7849	0,1458	2,5
	0,0047	6,81	5,017	5,9463			
	0,0047	6,50	5,013	5,6628			
H	0,0047	5,25	5,003	4,5095	4,4830	0,0832	1,9
	0,0047	5,13	5,012	4,3898			
	0,0047	5,30	5,010	4,5497			
I	0,0047	6,22	5,012	5,4035	5,2681	0,1519	2,9
	0,0047	6,11	5,016	5,2970			
	0,0047	5,90	5,014	5,1039			
J	0,0047	5,91	5,011	5,1162	5,1507	0,0313	0,6
	0,0047	5,97	5,006	5,1772			
	0,0047	5,96	5,015	5,1586			
K	0,0043	4,65	5,010	3,7286	3,6928	0,0653	1,8
	0,0043	4,52	5,009	3,6174			
	0,0043	4,65	5,005	3,7323			
L	0,0043	3,30	5,008	2,5671	2,6531	0,1153	4,3
	0,0043	3,35	5,012	2,6081			
	0,0043	3,55	5,005	2,7842			
M	0,0043	3,90	5,012	3,0815	3,0680	0,0656	2,1

	0,0043	3,80	5,010	2,9967			
	0,0043	3,95	5,010	3,1258			
	0,0043	1,40	5,018	0,9285			
N	0,0043	1,40	5,024	0,9274	0,9285	0,0011	0,1
	0,0043	1,40	5,012	0,9296			
	0,0043	4,10	5,011	3,2543			
O	0,0043	4,15	5,017	3,2934	3,3236	0,0883	2,7
	0,0043	4,30	5,016	3,4231			
	0,0043	1,40	5,016	0,9289			
P	0,0043	1,50	5,008	1,0165	0,9867	0,0501	5,1
	0,0043	1,50	5,017	1,0147			
	0,0043	0,85	5,012	0,4562			
Q	0,0043	0,90	5,015	0,4989	0,4846	0,0246	5,1
	0,0043	0,90	5,017	0,4987			
	0,0043	0,70	5,004	0,3276			
R	0,0043	0,70	5,009	0,3273	0,3188	0,0149	4,7
	0,0043	0,67	5,007	0,3016			
	0,0043	5,30	5,009	4,2892			
S	0,0043	5,40	5,007	4,3771	4,3555	0,0586	1,3
	0,0043	5,43	5,010	4,4003			
	0,0043	5,65	5,008	4,5915			
T	0,0043	5,70	5,004	4,6383	4,6209	0,0256	0,6
	0,0043	5,70	5,010	4,6328			

5 Diferenças entre as metodologias

Tabela 12. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ STD e pelo método oficial modificado.

Amostra	IP (meq/kg) - kit	IP (meq/kg) - AOCS	Diferença (%)	V gasto (mL) - AOCS
	1,3056	1,1081	17,8	1,60
A	1,2444	1,0908	14,1	1,58
	1,2852	1,0622	21,0	1,55
	1,0404	0,8207	26,8	1,30
B	1,2240	0,8668	41,2	1,35
	1,1628	0,7741	50,2	1,25
	2,4021	1,4770	62,6	2,00
C	2,0770	1,6163	28,5	2,15
	1,9750	1,5058	31,2	2,03
	2,2797	1,3869	64,4	1,90
D	2,3001	1,4805	55,4	2,00
	2,3409	1,4351	63,1	1,95

	2,1790	1,3002	67,6	1,81
E	1,9750	1,1974	64,9	1,70
	1,9151	1,1983	59,8	1,70
	1,9546	1,0607	84,3	1,55
F	2,2797	1,0156	124,5	1,50
	2,0566	1,1081	85,6	1,60
	2,3001	5,7455	-60,0	6,60
G	2,3817	5,9463	-59,9	6,81
	2,7272	5,6628	-51,8	6,50
	1,6295	4,5095	-63,9	5,25
H	1,8539	4,3898	-57,8	5,13
	1,8335	4,5497	-59,7	5,30
	1,9342	5,4035	-64,2	6,22
I	1,8743	5,2970	-64,6	6,11
	2,1994	5,1039	-56,9	5,90
	1,6499	5,1162	-67,8	5,91
J	1,7927	5,1772	-65,4	5,97
	1,9342	5,1586	-62,5	5,96
	4,6805	3,7286	25,5	4,65
K	5,1319	3,6174	41,9	4,52
	4,6997	3,7323	25,9	4,65
	4,6053	2,5671	79,4	3,30
L	4,3044	2,6081	65,0	3,35
	4,0405	2,7842	45,1	3,55
	4,5479	3,0815	47,6	3,90
M	4,6805	2,9967	56,2	3,80
	4,6614	3,1258	49,1	3,95
	2,2529	0,9285	142,6	1,40
N	2,7795	0,9274	199,7	1,40
	2,4977	0,9296	168,7	1,40
	4,6997	3,2543	44,4	4,10
O	4,9623	3,2934	50,7	4,15
	5,5463	3,4231	62,0	4,30
	1,4816	0,9289	59,5	1,40
P	1,3872	1,0165	36,5	1,50
	1,6881	1,0147	66,4	1,50
	1,6320	0,4562	257,7	0,85
Q	1,6511	0,4989	231,0	0,90
	1,6511	0,4987	231,1	0,90
	1,6320	0,3276	398,2	0,70
R	1,5568	0,3273	375,6	0,70
	1,5759	0,3016	422,5	0,67
	4,4727	4,2892	4,3	5,30
S	4,7366	4,3771	8,2	5,40
	4,6614	4,4003	5,9	5,43
	6,4490	4,5915	40,5	5,65
T	6,2985	4,6383	35,8	5,70
	5,7528	4,6328	24,2	5,70

APÊNDICE H-2 – Resultados experimentais de IP de óleos refinados: método oficial modificado

1 Reagentes do *kit PeroxySafe™ HSY*

- calibradores: 550202 B - lote 2029002 / 550203 B - lote 2030002 / 550204 B - lote 2031002 / 550205 B - lote 2032002 / 550206 B - lote 033002 (1 a 5, respectivamente) - validade: 30/10/2004;
- reagente A: 550001 P - lote RD.Br – validade: 30/12/2004;
- reagente B: 550002 P - lote 4301005 – validade: 30/10/2004;
- reagente C: 550003 P - lote RD.Br – validade: 31/12/2004;
- controles: 550114B - lote RD.Br / 550115B - lote RD.Br / 550113B - lote RD.Br (*low, medium e high*, respectivamente) – validade: 30/12/2004; e,
- reagente de preparação: lote 2036002 – validade: 11/2005.

2 Amostras

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit PeroxySafe™ HSY*.

Amostra	Descrição	Embalagem	Volume (mL)	Vencimento	Lote
A	óleo de algodão	PET	900	05/2005 GPR	LO 504 09:11 06
B	óleo de canola	PET	900	19/6/2005	L:0904005
C	óleo de canola	PET	900	14/6/2005	L 25 02:38
D	óleo de girassol	PET	900	mar/05	L 2605 (16:15C)
E	óleo de girassol	PET	900	29/1/2005	L 1304 (22:24A)
F	óleo de girassol	PET	900	29/1/2005	L 1304 (22:23A)
G	óleo de girassol (Argentina)	PET	900	18/5/2006	L 45058 01:27
H	óleo de girassol (Argentina)	PET	900	5/11/2005	L:06/11/03 21:10
I	óleo de girassol	PET	900	03/2005 GPI	LO 304 09:02 19

J	óleo de girassol	PET	900	ago/04	LT 1111 (20:46C)
K	óleo de milho	PET	900	29/6/2005	L 27 11:33 MK
L	óleo de milho	PET	900	24/12/2004	20:10
M	óleo de milho	PET	900	06/2005 GPR	LO 604 15:24 10
N	óleo de gergelim	vidro		20/7/2004	23
O	óleo de soja	PET	900	nov/05	LR 00507 P
P	óleo de soja	PET	900	8/5/2005	22:56
Q	óleo de soja	lata	900	05/2004 CGR	LO 504 14:42:20
R	óleo de soja	PET	900	out/04	LCGO 418
S	óleo de soja vitaminado	PET	900	03/2005 ORH	LO 304 11:01 15
T	óleo de soja	lata	900	25/12/2004	-

3 TESTES COM O *kit*

3.1 Curva de calibração 1: amostras A a J

Reagente Branco = 0,104

Equação: $y = 0,459 x - 0,007$, $r = 0,9944$

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit* PeroxySafe™ HSY, amostras A a J.

Conc. (meq/kg)	Absorbância	%dif pred.
0,009	0,025	27,2
0,014	0,050	-12,5
0,036	0,100	-8,8
0,087	0,200	2,1

Excluindo o primeiro ponto, cuja diferença predita foi elevada, obteve-se:

Equação: $y = 0,493 x - 0,012$; $r = 0,9992$

Teste dos controles

Tabela 3. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorb	IP (meq/kg)	IP Médio	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,011	0,0469	0,0501	15,7	0,03-0,05
	0,010	0,0443			
	0,017	0,0590			
<i>low</i>	0,010	0,044	0,0430	4,4	0,03-0,05
	0,009	0,042			
	0,003	0,0188			
<i>medium</i>	0,046	0,1180	0,1023	14,0	0,065-0,085
	0,037	0,0992			
	0,032	0,0898			
<i>medium</i>	0,020	0,0657	0,0617	6,5	0,065-0,085
	0,017	0,0577			
	0,019	0,0617			
<i>high</i>	0,065	0,1569	0,1609	5,1	0,14-0,16
	0,065	0,1556			
	0,072	0,1703			

A diferença do valor do controle *medium* foi de 5,01%, em relação ao limite inferior da faixa de tolerância e, dessa forma, foi aceito.

3.2 Curva de calibração 2: amostras K a T

Reagente Branco = 0,083

Equação: $y = 0,444 x - 0,001$, $r = 0,9990$

Tabela 4. Curva de calibração 2 para o *kit PeroxySafe™* HSY, amostras K a T.

Absorb.	Conc. (meq/kg)	Dif. predita (%)
0,011	0,025	5,5
0,019	0,050	-9,2
0,045	0,100	3,7
0,087	0,200	-0,5

Teste dos controles

Tabela 5. Teste dos controles HSY para a Curva de calibração 2.

Controle	Absorb.	IP (meq/kg)	IP médio	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,024	0,0577	0,0562	4,6	0,03-0,05
	0,024	0,0577			
	0,022	0,0532			
	0,028	0,0651			
<i>medium</i>	0,036	0,0830	0,0736	12,2	0,065-0,085
	0,031	0,0726			
	0,070	0,1603			
	0,106	0,1484			
<i>high</i>	-	-	0,1544	5,5	0,14-0,16

Low: 12,4% de diferença em relação do limite superior.

Medium: apesar do valor de CV estar acima do tolerado (10%), todos os valores estão dentro da faixa esperada.

High: apesar da análise ter sido feita em duplicata, os valores obtidos estão dentro da faixa esperada.

3.3 Determinação de Índice de Peróxidos, através do kit

Diluições utilizadas:

- 12,8 => 200 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação; e,
- 40,2 => 60 µL de amostra + 2,35 mL de Reagente de Preparação.

Tabela 6. Resultados experimentais com o *kit PeroxySafe™* HSY.

Amostra	IP (meq/kg)	Diluição	IP (meq/kg)	IP médio	DP	CV (%)
A	0,0778	12,8	0,9920	1,0604	0,0617	5,8
	0,0845	12,8	1,0774			
	0,0872	12,8	1,1118			
	0,2226	12,8	2,8382			
B	0,1904	12,8	2,4276	2,5874	0,2199	8,5
	0,1958	12,8	2,4965			
	0,0630	12,8	0,8033			
C	0,0536	12,8	0,6834	0,7578	0,0649	8,6
	0,0617	12,8	0,7867			

	0,1408	12,8	1,7952			
D	0,1314	12,8	1,6754	1,7098	0,0744	4,4
	0,1301	12,8	1,6588			
	0,1636	40,2	6,5718			
E	0,1408	40,2	5,6559	6,3388	0,6013	9,5
	0,1690	40,2	6,7887			
	0,1743	40,2	7,0016			
F	0,2025	40,2	8,1344	7,5948	0,5683	7,5
	0,1904	40,2	7,6484			
	0,1676	40,2	6,7325			
G	0,1703	40,2	6,8410	6,8945	0,1944	2,8
	0,1770	40,2	7,1101			
	0,1596	40,2	6,4111			
H	0,1609	40,2	6,4634	6,2665	0,2969	4,7
	0,1475	40,2	5,9251			
	0,1301	40,2	5,2261			
I	0,1475	40,2	5,9251	5,7818	0,4997	8,6
	0,1542	40,2	6,1942			
	0,1837	40,2	7,3792			
J	0,2079	40,2	8,3513	7,5961	0,6735	8,9
	0,1757	40,2	7,0579			
	0,0696	12,8	0,8874			
K	0,0845	12,8	1,0774	0,9758	0,0957	9,8
	0,0755	12,8	0,9626			
	0,1008	12,8	1,2852			
L	0,1023	12,8	1,3043	1,2980	0,0110	0,9
	0,1023	12,8	1,3043			
	0,0502	12,8	0,6401			
M	0,0592	12,8	0,7548	0,7166	0,0663	9,2
	0,0592	12,8	0,7548			
	0,0815	40,2	3,2739			
N	0,0740	40,2	2,9726	3,0730	0,1739	5,7
	0,0740	40,2	2,9726			
	0,1157	12,8	1,4752			
O	0,1276	12,8	1,6269	1,5385	0,0789	5,1
	0,1187	12,8	1,5134			
	0,1053	12,8	1,3426			
P	0,1246	12,8	1,5887	1,4939	0,1324	8,9
	0,1216	12,8	1,5504			
	0,0696	12,8	0,8874			
Q	0,0726	12,8	0,9257	0,9129	0,0221	2,4
	0,0726	12,8	0,9257			

R	0,1127	12,8	1,4369	1,4561	0,0506	3,5
	0,1112	12,8	1,4178			
	0,1187	12,8	1,5134			
S	0,1127	12,8	1,4369	1,5066	0,1207	8,0
	0,1291	12,8	1,6460			
	0,1484	40,2	5,9612			
T	0,1291	40,2	5,1859	5,7028	0,4476	7,8
	0,1484	40,2	5,9612			

4 Índice de peróxidos através da metodologia AOCS Cd 8b – 90 modificada

Tabela 7. Resultados experimentais de IP pelo método oficial.

Amostra	N	V (mL)	Massa (g)	IP (meq/kg)	IP Médio	DP	CV (%)
A	0,0046	0,85	5,004	0,5501	0,5562	0,0105	1,9
	0,0046	0,87	5,005	0,5683			
	0,0046	0,85	5,004	0,5501			
B	0,0046	0,95	5,012	0,6408	0,6222	0,0245	3,9
	0,0046	0,90	5,017	0,5944			
	0,0046	0,94	5,014	0,6314			
C	0,0046	0,55	5,018	0,2743	0,2745	0,0002	0,1
	0,0046	0,55	5,014	0,2745			
	0,0046	0,55	5,012	0,2746			
D	0,0046	1,00	5,014	0,6863	0,7079	0,0231	3,3
	0,0046	1,05	5,012	0,7323			
	0,0046	1,02	5,009	0,7053			
E	0,0046	4,30	5,018	3,7028	3,7186	0,0247	0,7
	0,0046	4,30	5,014	3,7058			
	0,0046	4,35	5,020	3,7471			
F	0,0046	4,55	5,011	3,9369	3,9588	0,0407	1,0
	0,0046	4,62	5,005	4,0058			
	0,0046	4,55	5,015	3,9338			
G	0,0046	3,85	5,009	3,2973	3,2550	0,0396	1,2
	0,0046	3,80	5,013	3,2489			
	0,0046	3,76	5,003	3,2188			
H	0,0046	4,20	5,016	3,6129	3,6019	0,0850	2,4
	0,0046	4,20	5,160	3,5120			
	0,0046	4,28	5,023	3,6809			
I	0,0046	2,87	5,003	2,4026	2,4758	0,0741	3,0

	0,0046	3,04	5,018	2,5509			
	0,0046	2,95	5,007	2,4740			
	0,0046	5,47	5,007	4,7830			
J	0,0046	5,45	5,003	4,7685	4,7608	0,0269	0,6
	0,0046	5,41	5,004	4,7309			
	0,0047	0,60	5,004	0,3743			
K	0,0047	0,60	5,006	0,3741	0,3742	0,0001	0,0
	0,0047	0,60	5,003	0,3743			
	0,0047	0,91	5,004	0,6643			
L	0,0047	0,92	5,009	0,6730	0,6640	0,0092	1,4
	0,0047	0,90	5,007	0,6546			
	0,0047	0,40	5,004	0,1871			
M	0,0047	0,40	5,006	0,1871	0,1871	0,0001	0,1
	0,0047	0,40	5,001	0,1872			
	0,0047	3,25	5,005	2,8532			
N	0,0047	3,21	5,002	2,8175	2,8783	0,0766	2,7
	0,0047	3,37	5,007	2,9643			
	0,0047	0,80	5,016	0,5601			
O	0,0047	0,77	5,019	0,5317	0,5354	0,0231	4,3
	0,0047	0,75	5,007	0,5143			
	0,0047	1,05	5,008	0,7947			
P	0,0047	1,00	5,012	0,7473	0,7785	0,0270	3,5
	0,0047	1,05	5,016	0,7934			
	0,0047	0,47	5,004	0,2526			
Q	0,0047	0,46	5,010	0,2430	0,2431	0,0095	3,9
	0,0047	0,45	5,008	0,2337			
	0,0047	1,00	5,002	0,7488			
R	0,0047	1,00	5,000	0,7491	0,7645	0,0269	3,5
	0,0047	1,05	5,002	0,7956			
	0,0047	1,10	5,007	0,8416			
S	0,0047	1,05	5,003	0,7955	0,8264	0,0268	3,2
	0,0047	1,10	5,004	0,8421			
	0,0047	4,25	5,009	3,7857			
T	0,0047	4,25	5,014	3,7819	3,7533	0,0529	1,4
	0,0047	4,15	5,009	3,6922			

5 Diferenças entre as metodologias

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ HSY e pela AOCS.

Amostra	IP (meq/kg) - kit	IP (meq/kg) - AOCS	Diferença (%)	V gasto (mL) - AOCS
A	0,9920	0,5501	80,3	0,85
	1,0774	0,5683	89,6	0,87
	1,1118	0,5501	102,1	0,85
	2,8382	0,6408	342,9	0,95
B	2,4276	0,5944	308,4	0,90
	2,4965	0,6314	295,4	0,94
	0,8033	0,2743	192,9	0,55
C	0,6834	0,2745	149,0	0,55
	0,7867	0,2746	186,5	0,55
	1,7952	0,6863	161,6	1,00
D	1,6754	0,7323	128,8	1,05
	1,6588	0,7053	135,2	1,02
	6,5718	3,7028	77,5	4,30
E	5,6559	3,7058	52,6	4,30
	6,7887	3,7471	81,2	4,35
	7,0016	3,9369	77,8	4,55
F	8,1344	4,0058	103,1	4,62
	7,6484	3,9338	94,4	4,55
	6,7325	3,2973	104,2	3,85
G	6,8410	3,2489	110,6	3,80
	7,1101	3,2188	120,9	3,76
	6,4111	3,6129	77,5	4,20
H	6,4634	3,5120	84,0	4,20
	5,9251	3,6809	61,0	4,28
	5,2261	2,4026	117,5	2,87
I	5,9251	2,5509	132,3	3,04
	6,1942	2,4740	150,4	2,95
	7,3792	4,7830	54,3	5,47
J	8,3513	4,7685	75,1	5,45
	7,0579	4,7309	49,2	5,41
	0,8874	0,3743	137,1	0,60
K	1,0774	0,3741	188,0	0,60
	0,9626	0,3743	157,2	0,60
	1,2852	0,6643	93,5	0,91
L	1,3043	0,6730	93,8	0,92
	1,3043	0,6546	99,3	0,90
	0,6401	0,1871	242,1	0,40
M	0,7548	0,1871	303,4	0,40
	0,7548	0,1872	303,2	0,40
N	3,2739	2,8532	14,7	3,25

	2,9726	2,8175	5,5	3,21
	2,9726	2,9643	0,3	3,37
	1,4752	0,5601	163,4	0,80
O	1,6269	0,5317	206,0	0,77
	1,5134	0,5143	194,3	0,75
	1,3426	0,7947	68,9	1,05
P	1,5887	0,7473	112,6	1,00
	1,5504	0,7934	95,4	1,05
	0,8874	0,2526	251,3	0,47
Q	0,9257	0,2430	280,9	0,46
	0,9257	0,2337	296,1	0,45
	1,4369	0,7488	91,9	1,00
R	1,4178	0,7491	89,3	1,00
	1,5134	0,7956	90,2	1,05
	1,4369	0,8416	70,7	1,10
S	1,4369	0,7955	80,6	1,05
	1,6460	0,8421	95,5	1,10
	5,9612	3,7857	57,5	4,25
T	5,1859	3,7819	37,1	4,25
	5,9612	3,6922	61,5	4,15

APÊNDICE I-1 – Resultados experimentais de concentração de alquenais e p-anisidina das amostras de óleos de fritura

1 Reagentes do *kit* AlkalSafe™ STD

- calibradores: lote 4321002 / 4322002 / 4323002 / 4324002 (1 a 4, respectivamente)
- validade: maio/2004;
- reagente A: lote 4319003 – validade: mar./2004;
- reagente B: 550010P / lote 4309004 – validade: 31/05/2005;
- controle AlkalSafe™ STD: 550200B - lote 2034003 nov./2004; e,
reagente de preparação: 550001P / lote RD. Br – validade: 30/12/2004.

2 Análises com o *kit* AlkalSafe™ STD

2.1 Curva de calibração 1: amostras A a J

Equação: $y = 0,001 x - 0,002$; $r = 0,998$

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o *kit* AlkalSafe™ STD, amostras A a J.

Conc. (nmol/mL)	Absorbância	Diferença (%)
8	0,009	5,5
12	0,019	-1,2
32	0,040	1,7
64	0,085	0,4

2.1.1 Teste do controle

Nos dois testes realizados (Tabela 2), o controle não estava na faixa predita de 14 a 18 nmol/mL.

Tabela 2. Testes do controle AlkalSafe™ STD para a Curva de calibração 1.

	Absorbância	Conc. (nmol/mL)	Conc. média	DP	CV (%)
Teste 1	-0,002	0,812	1,124	0,539	48,0
	-0,002	0,812			
	-0,001	1,746			
Teste 2	-0,005	-1,523	-1,523	0,467	-30,7
	-0,006	-1,990			
	-0,005	-1,056			
	-0,005	-1,056			

2.2 Curva de calibração 2: amostras K a T

Equação: $y = 0,001 x - 0,003$; $r = 0,9999$

Tabela 3. Curva de calibração 2 para o kit AlkalSafe™ STD, amostras K a T.

Conc. (nmol/mL)	Absorbância	Diferença (%)
8	0,009	4,3
12	0,019	-2,0
32	0,040	-0,5
64	0,084	0,2

2.2.1 Teste do controle

Novamente o controle não estava na faixa esperada (Tabela 4).

Tabela 4. Teste do controle AlkalSafe™ STD para a Curva de calibração 2.

Absorbância	Conc. (nmol/mL)	Conc. média	DP	CV (%)
-0,001	2,1716	3,282	1,197	36,5
0,003	4,5502			
0,001	3,1230			

2.3 Amostras

Tabela 5. Resultados experimentais com o *kit* AlkalSafe™ STD.

Amostra	Conc. (nmol/mL)	Diluição	Conc. Final (nmol/mL)	Conc. Média (nmol/mL)	DP	CV (%)
A	12,872	1,0	12,872	14,177	1,130	8,0
	14,830	1,0	14,830			
	14,830	1,0	14,830			
B	10,426	22,0	229,372	215,013	12,435	5,8
	9,4470	22,0	207,834			
	9,4470	22,0	207,834			
C	13,851	22,0	304,722	297,543	12,435	4,2
	13,851	22,0	304,722			
	12,872	22,0	283,184			
D	14,340	22,0	315,480	319,073	6,224	2,0
	14,340	22,0	315,480			
	14,830	22,0	326,260			
E	11,894	22,0	261,668	265,254	6,211	2,3
	12,383	22,0	272,426			
	11,894	22,0	261,668			
F	17,277	22,0	380,094	387,266	22,416	5,8
	16,787	22,0	369,314			
	18,745	22,0	412,390			
G	27,064	22,0	595,408	584,635	10,769	1,8
	26,085	22,0	573,870			
	26,574	22,0	584,628			
H	27,064	22,0	595,408	602,580	32,888	5,5
	29,021	22,0	638,462			
	26,085	22,0	573,870			
I	27,064	22,0	595,408	595,408	0,000	0,0
	27,064	22,0	595,408			
	28,532	22,0	627,704			
J	29,511	22,0	649,242	649,235	21,527	3,3
	30,489	22,0	670,758			
	21,525	22,0	473,550			
K	21,989	22,0	483,758	476,953	5,894	1,2
	21,525	22,0	473,550			
L	15,952	22,0	350,944	378,180	31,210	8,3
	16,880	22,0	371,360			

	18,738	22,0	412,236			
	18,738	22,0	412,236			
M	18,738	22,0	412,236	422,451	17,693	4,2
	20,131	22,0	442,882			
	19,667	22,0	432,674			
N	18,274	22,0	402,028	419,049	15,603	3,7
	19,202	22,0	422,444			
	28,491	22,0	626,802			
O	25,240	22,0	555,280	572,308	48,287	8,4
	24,311	22,0	534,842			
	23,846	22,0	524,612			
P	26,633	22,0	585,926	558,675	31,220	5,6
	25,704	22,0	565,488			
	22,918	22,0	504,196			
Q	23,382	22,0	514,404	493,973	27,033	5,5
	21,060	22,0	463,320			
	21,989	22,0	483,758			
R	20,596	22,0	453,112	470,140	15,605	3,3
	21,525	22,0	473,550			
	23,382	22,0	514,404			
S	23,846	22,0	524,612	514,404	10,208	2,0
	22,918	22,0	504,196			
	22,918	22,0	504,196			
T	24,775	22,0	545,050	531,432	23,587	4,4
	24,775	22,0	545,050			

2.4 Correção de cor

Tabela 6. Concentrações de alquenais obtidas com o *kit* AlkalSafe™ STD, após a correção de cor.

Amostra	Conc. obtida (nmol/mL)	Correção (nmol/mL)	Conc. Corrigida (nmol/mL)
	12,872	0,000	12,872
A	14,830	0,000	14,830
	14,830	0,000	14,830
	229,372	0,000	229,372
B	207,834	0,000	207,834
	207,834	0,000	207,834
	304,722	0,000	304,722
C	304,722	0,000	304,722
	283,184	0,000	283,184
D	315,480	0,000	315,480
	315,480	0,000	315,480

	326,260	0,000	326,260
	261,668	0,000	261,668
E	272,426	0,000	272,426
	261,668	0,000	261,668
	380,094	0,000	380,094
F	369,314	0,000	369,314
	412,390	0,000	412,390
	595,408	0,000	595,408
G	573,870	0,000	573,870
	584,628	0,000	584,628
	595,408	13,999	581,409
H	638,462	13,999	624,463
	573,870	13,999	559,871
	595,408	0,000	595,408
I	595,408	0,000	595,408
	595,408	0,000	595,408
	627,704	0,000	627,704
J	649,242	0,000	649,242
	670,758	0,000	670,758
	485,144	15,5381	469,606
K	495,902	15,5381	480,364
	485,144	15,5381	469,606
	366,784	13,486	353,298
L	377,542	13,486	364,056
	366,784	13,486	353,298
	356,026	15,025	341,001
M	388,300	15,025	373,275
	399,058	15,025	384,033
	463,628	6,6478	456,980
N	452,870	6,6478	446,222
	431,354	6,6478	424,706
	626,802	0,000	626,802
O	555,280	0,000	555,280
	534,842	0,000	534,842
	524,612	0,000	524,612
P	585,926	0,000	585,926
	565,488	0,000	565,488
	504,196	13,6575	490,539
Q	514,404	13,6575	500,747
	463,320	13,6575	449,663
	483,758	16,7345	467,024
R	453,112	16,7345	436,378
	473,550	16,7345	456,816
	514,404	0,000	514,404
S	524,612	0,000	524,612
	504,196	0,000	504,196
	504,196	11,264	492,932
T	545,050	11,264	533,786
	545,050	11,264	533,786

3 Teste de p-anisidina, segundo AOCS

Tabela 7. Resultados experimentais de p-anisidina.

Amostra	massa (g)	Ab	Am	Abranco	As	p-anisidina	Média	DP	CV (%)
A	0,5057	0,050	0,384	0,170	0,214	10,2	8,5	1,5	17,5
	0,5057	0,050	0,337	0,170	0,167	7,4			
	0,5057	0,050	0,345	0,170	0,175	7,9			
B	0,4202	0,110	0,587	0,172	0,415	23,1	21,8	1,3	6,1
	0,4202	0,110	0,569	0,172	0,397	21,8			
	0,4202	0,110	0,550	0,172	0,378	20,4			
C	0,3179	0,053	0,533	0,167	0,366	30,4	31,6	1,4	4,6
	0,3179	0,053	0,543	0,167	0,376	31,3			
	0,3179	0,053	0,563	0,167	0,396	33,2			
D	0,5271	0,232	0,930	0,167	0,763	32,4	30,9	1,3	4,4
	0,5271	0,232	0,919	0,201	0,718	29,9			
	0,5271	0,232	0,929	0,201	0,728	30,4			
E	0,3108	0,087	0,530	0,146	0,384	30,1	31,1	2,2	7,0
	0,3108	0,087	0,567	0,146	0,421	33,6			
	0,3108	0,087	0,526	0,146	0,380	29,7			
F	0,3242	0,105	0,794	0,210	0,584	45,9	43,2	4,3	10,0
	0,3242	0,105	0,710	0,210	0,500	38,2			
	0,3242	0,105	0,788	0,210	0,578	45,4			
G	0,3093	0,140	0,570	0,162	0,408	28,3	31,2	4,0	12,8
	0,3093	0,140	0,647	0,162	0,485	35,7			
	0,3093	0,140	0,584	0,162	0,422	29,6			
H	0,3041	0,151	0,609	0,053	0,556	42,4	43,4	1,1	2,4
	0,3041	0,151	0,616	0,053	0,563	43,1			
	0,3041	0,151	0,630	0,053	0,577	44,5			
I	0,3222	0,136	0,948	0,126	0,822	66,0	64,3	3,7	5,8
	0,3222	0,136	0,958	0,126	0,832	66,9			
	0,3222	0,136	0,884	0,126	0,758	60,0			
J	0,3091	0,198	0,681	0,131	0,550	37,4	38,5	2,9	7,5
	0,3091	0,198	0,671	0,131	0,540	36,4			
	0,3091	0,198	0,727	0,131	0,596	41,8			
K	0,2612	0,092	0,565	0,074	0,491	47,6	48,6	1,7	3,5
	0,2612	0,092	0,565	0,074	0,491	47,6			
	0,2612	0,092	0,591	0,074	0,517	50,6			
L	0,2544	0,140	0,476	0,029	0,447	39,0	40,2	3,4	8,5
	0,2544	0,140	0,464	0,029	0,435	37,5			

	0,2544	0,140	0,519	0,029	0,490	44,0			
	0,2561	0,209	0,525	0,069	0,456	33,0			
M	0,2561	0,209	0,513	0,069	0,444	31,6	31,6	1,4	4,4
	0,2561	0,209	0,501	0,069	0,432	30,2			
	0,2771	0,120	0,586	0,071	0,515	44,9			
N	0,2771	0,120	0,579	0,071	0,508	44,2	46,1	2,7	5,8
	0,2771	0,120	0,625	0,071	0,554	49,2			
	0,5035	0,211	0,891	0,052	0,839	39,5			
O	0,5035	0,211	0,906	0,052	0,854	40,4	39,9	0,5	1,1
	0,5035	0,211	0,896	0,052	0,844	39,8			
	0,4383	0,108	0,881	0,106	0,775	46,9			
P	0,4383	0,108	0,899	0,106	0,793	48,1	47,9	0,9	1,8
	0,4383	0,108	0,906	0,106	0,800	48,6			
	0,3163	0,170	0,819	0,115	0,704	53,3			
Q	0,3163	0,170	0,772	0,115	0,657	48,9	52,2	3,0	5,7
	0,3163	0,170	0,831	0,115	0,716	54,5			
	0,3124	0,202	0,490	0,139	0,351	17,5			
R	0,3124	0,202	0,609	0,139	0,470	29,0	25,4	6,8	26,7
	0,3124	0,202	0,615	0,139	0,476	29,5			
	0,3138	0,205	0,734	0,086	0,648	45,6			
S	0,3138	0,205	0,791	0,086	0,705	51,1	47,7	3,0	6,2
	0,3138	0,205	0,742	0,086	0,656	46,4			
	0,3108	0,165	0,810	0,103	0,707	55,0			
T	0,3108	0,165	0,767	0,103	0,664	50,8	54,9	4,0	7,3
	0,3108	0,165	0,850	0,103	0,747	58,8			

4 Diferenças entre as metodologias

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de concentração de alquenais, obtidos pelo *kit* AlkalSafe™ STD, e p-anisidina.

Amostra	Valor de anisidina (VA)	Conc. alquenais (nmol/mL)	Razão VA / Conc. alquenais
A	10,2	12,872	0,794
	7,4	14,830	0,501
	7,9	14,830	0,533
B	23,1	229,372	0,101
	21,8	207,834	0,105
	20,4	207,834	0,098
C	30,4	304,722	0,100
	31,3	304,722	0,103
	33,2	283,184	0,117
D	32,4	315,480	0,103
	29,9	315,480	0,095
	30,4	326,260	0,093
E	30,1	261,668	0,115
	33,6	272,426	0,123
	29,7	261,668	0,113
F	45,9	380,094	0,121
	38,2	369,314	0,103
	45,4	412,390	0,110
G	30,8	595,408	0,052
	40,3	573,870	0,070
	48,8	584,628	0,083
H	42,4	581,409	0,073
	43,1	624,463	0,069
	44,5	559,871	0,079
I	66,0	595,408	0,111
	66,9	595,408	0,112
	60,0	595,408	0,101
J	37,4	627,704	0,060
	36,4	649,242	0,056
	41,8	670,758	0,062
K	47,6	469,606	0,101
	47,6	480,364	0,099
	50,6	469,606	0,108
L	39,0	353,298	0,110
	37,5	364,056	0,103

	44,0	353,298	0,125
	33,0	341,001	0,097
M	31,6	373,275	0,085
	30,2	384,033	0,079
	44,9	456,980	0,098
N	44,2	446,222	0,099
	49,2	424,706	0,116
	39,5	626,802	0,063
O	40,4	555,280	0,073
	39,8	534,842	0,074
	46,9	524,612	0,089
P	48,1	585,926	0,082
	48,6	565,488	0,086
	53,3	490,539	0,109
Q	48,9	500,747	0,098
	54,5	449,663	0,121
	17,5	467,024	0,038
R	29,0	436,378	0,066
	29,5	456,816	0,065
	45,6	514,404	0,089
S	51,1	524,612	0,097
	46,4	504,196	0,092
	55,0	492,932	0,112
T	50,8	533,786	0,095
	58,8	533,786	0,110

APÊNDICE I-2 – Resultados experimentais de concentração de malonaldeído e TBA das amostras de óleos de fritura

1 Reagentes do *kit* AldeSafe™ STD

- calibradores: lote 4303003 / 4304003 / 4305003 / 4306003 / 4307003 (1 a 5, respectivamente) - validade: dez./2004;
- reagente A: lote 4308002 – validade: jun./2004;
- reagente B: lote 4309004 – validade: abr./2005;
- controles: 550015B - lote 0846002 / 550014B - lote 0845002 / 550013B - lote 0844002 (*low*, *medium* e *high*, respectivamente) – validade: 30/10/2004; e,
- reagente de preparação: 550001P / lote RD. Br – validade: 30/12/2004.

2 Análises com o *kit* AldeSafe™ STD

2.1 Curva de calibração 1: amostras A a L

Equação: $y = 0,002 x - 0,003$; $r = 0,9994$

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o *kit* AldeSafe™ STD, amostras A a L.

Conc. (nmol/mL)	Absorbância	Diferença (%)
0	-0,004	100,0
5	0,011	17,9
10	0,018	-7,3
25	0,053	-0,5
50	0,110	0,2

2.1.1 Teste dos controles

Tabela 2. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controles	Absorb	Conc. (nmol/mL)	Conc. Média	CV (%)	Referência
<i>Low</i>	0,017	9,0226	8,7293	3,4	8,5-10,5
	0,016	8,4359			
	0,017	8,7293			
<i>Medium</i>	0,036	17,237	16,944*	3,0	17,5-19,5
	0,034	16,357			
	0,036	17,237			
	0,072	33,373			
<i>high</i>	0,071	32,786	32,982	1,0	33,0-37,0
	0,071	32,786			

*controle *médium*: 3,2% do limite inferior da faixa de referência.

2.2 Curva de calibração 2: amostras M a T

Equação: $y = 0,002 x - 0,003$; $r = 0,9998$

Tabela 3. Curva de calibração 2 para o *kit* AldeSafe™ STD, amostras M a T.

Conc. (nmol/mL)	Absorbância	Diferença (%)
0	-0,003	100,0
5	0,006	-8,8
10	0,017	3,9
25	0,046	1,8
50	0,093	-0,5

2.2.1 Teste dos controles

Tabela 4. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.

Controles	Absorb	Conc. (nmol/mL)	Conc. Média	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,016	9,7252	9,4972	2,1	8,5-10,5
	0,015	9,3832			
	0,015	9,3832			
<i>medium</i>	0,033	18,615	18,387	3,9	17,5-19,5
	0,034	18,957			
	0,031	17,590			
	0,062	33,661			
<i>high</i>	0,065	35,028	34,344	2,0	33,0-37,0
	0,063	34,344			

2.3 Amostras: sem diluição

Tabela 5. Resultados experimentais com o *kit* AldeSafe™ STD.

Amostra	Conc. (nmol/mL)	Correção (nmol/mL)	Conc. Final	Conc. Média	DP	CV (%)
A	-1,2455	0,000	-1,246	-1,2455	0,8801	-70,7
	-2,1256	0,000	-2,126			
	-0,3654	0,000	-0,365			
	9,0226	0,000	9,023			
B	8,7293	0,000	8,729	9,4140	0,9433	10,0
	10,49	0,000	10,490			
	14,303	0,000	14,303			
C	15,184	0,000	15,184	14,792	0,449	3,0
	14,890	0,000	14,890			
	16,357	0,000	16,357			
D	16,357	0,000	16,357	16,357	0,000	0,0
	16,357	0,000	16,357			
	16,064	0,000	16,064			
E	15,184	0,000	15,184	15,673	0,448	2,9
	15,770	0,000	15,770			
	24,865	0,000	24,865			
F	25,158	0,000	25,158	24,865	0,293	1,2
	24,572	0,000	24,572			
	25,452	0,000	25,452			
G	26,332	0,000	26,332	25,647	0,611	2,4
	25,158	0,000	25,158			
	26,039	13,999	12,040			
H	26,039	13,999	12,040	12,235	0,338	2,8
	26,625	13,999	12,626			
	30,439	0,000	30,439			
I	33,373	0,000	33,373	31,124	1,997	6,4
	29,559	0,000	29,559			
	33,960	0,000	33,960			
J	34,253	0,000	34,253	35,231	1,953	5,5
	37,480	0,000	37,480			
	37,187	15,5381	21,649			
K	37,187	15,5381	21,649	21,453	0,339	1,6
	36,600	15,5381	21,062			
	28,092	13,486	14,606			
L	28,679	13,486	15,193	15,193	0,587	3,9
	29,266	13,486	15,780			
	36,054	15,025	21,029			
M	36,396	15,025	21,371	21,485	0,522	2,4
	37,080	15,025	22,055			
	36,396	6,6478	29,748			
N	36,396	6,6478	29,748	29,520	0,395	1,3
	35,712	6,6478	29,064			

O	31,267	0,000	31,267	32,635	1,368	4,2
	32,635	0,000	32,635			
	34,002	0,000	34,002			
P	32,977	0,000	32,977	32,749	0,197	0,6
	32,635	0,000	32,635			
	32,635	0,000	32,635			
Q	32,635	13,6575	18,978	19,434	0,522	2,7
	32,977	13,6575	19,320			
	33,661	13,6575	20,004			
R	21,693	16,7345	4,9585	4,9585	0,0000	0,0
	21,693	16,7345	4,9585			
	21,693	16,7345	4,9585			
S	36,738	0,000	36,738	37,308	0,987	2,6
	36,738	0,000	36,738			
	38,448	0,000	38,448			
T	42,893	11,264	31,629	28,323	3,250	11,5
	36,396	11,264	25,132			
	39,473	11,264	28,209			

3 TBA, segundo AOCS

Tabela 6. Resultados experimentais de TBA.

Amostra	Massa (g)	Abs (A)	Branco	n° TBA	n° TBA médio	DP	CV (%)
A	0,2251	0,196	0,008	0,017	0,028	0,009	33,2
	0,2221	0,346	0,008	0,031			
	0,2026	0,355	0,008	0,035			
B	0,2216	0,342	0,008	0,031	0,034	0,004	11,4
	0,2216	0,359	0,008	0,032			
	0,2315	0,442	0,010	0,038			
C	0,2185	0,586	0,241	0,032	0,030	0,001	3,6
	0,2102	0,553	0,241	0,030			
	0,2780	0,654	0,241	0,030			
D	0,2183	0,460	0,241	0,020	0,027	0,009	33,1
	0,2067	0,485	0,241	0,024			
	0,2157	0,398	0,010	0,037			
E	0,3118	0,613	0,006	0,039	0,039	0,000	1,0
	0,3170	0,618	0,006	0,039			
	0,3161	0,609	0,006	0,039			
F	0,2136	0,570	0,241	0,031	0,023	0,007	28,0
	0,2373	0,479	0,241	0,020			
	0,2342	0,464	0,241	0,019			
G	0,2538	0,404	0,010	0,032	0,033	0,004	10,8

	0,2735	0,497	0,010	0,036			
	0,2462	0,362	0,010	0,029			
	0,2224	0,289	0,010	0,026			
H	0,2248	0,504	0,010	0,045	0,033	0,010	30,2
	0,2109	0,308	0,010	0,029			
	0,2276	0,378	0,010	0,033			
I	0,2163	0,385	0,010	0,036	0,038	0,007	18,5
	0,2270	0,528	0,010	0,047			
	0,2555	0,412	0,008	0,032			
J	0,2041	0,409	0,008	0,040	0,033	0,007	20,5
	0,2103	0,280	0,008	0,027			
	0,2438	0,416	0,010	0,034			
K	0,2098	0,311	0,010	0,030	0,032	0,002	7,0
	0,2233	0,357	0,010	0,032			
	0,3161	0,649	0,010	0,041			
L	0,3178	0,657	0,010	0,041	0,040	0,002	4,7
	0,3241	0,615	0,010	0,038			
	0,2454	0,298	0,006	0,024			
M	0,2497	0,252	0,006	0,020	0,025	0,005	18,8
	0,2650	0,390	0,006	0,029			
	0,2299	0,185	0,006	0,016			
N	0,2135	0,212	0,006	0,020	0,018	0,002	11,2
	0,2242	0,218	0,006	0,019			
	0,2113	0,340	0,006	0,032			
O	0,2067	0,194	0,006	0,019	0,024	0,007	29,0
	0,2268	0,247	0,006	0,022			
	0,3601	0,419	0,006	0,023			
P	0,3557	0,622	0,006	0,035	0,030	0,006	20,6
	0,3591	0,593	0,006	0,033			
	0,3600	0,663	0,006	0,037			
Q	0,3583	0,637	0,006	0,036	0,036	0,001	2,4
	0,3616	0,636	0,006	0,035			
	0,3622	0,611	0,006	0,034			
R	0,3688	0,590	0,006	0,032	0,032	0,001	3,5
	0,3831	0,605	0,006	0,032			
	0,2314	0,174	0,006	0,015			
S	0,2324	0,252	0,006	0,022	0,021	0,006	27,0
	0,2326	0,306	0,006	0,026			
	0,2535	0,424	0,006	0,033			
T	0,2385	0,411	0,006	0,034	0,027	0,012	43,7
	0,2630	0,177	0,006	0,013			

4 Diferenças entre as metodologias

Tabela 7. Tabela comparativa dos resultados experimentais de concentração de malonaldeído, obtidos pelo *kit* AdeSafe™ STD, e número de TBA.

Amostra	kit	nº TBA	kit/TBA	Amostra	kit	nº TBA	kit/TBA
A	-1,246	0,0174	-	K	21,649	0,0341	634,4
	-2,126	0,0312	-		21,649	0,0296	730,2
	-0,365	0,0350	-		21,062	0,0320	658,7
B	9,023	0,0309	292,3	L	14,606	0,0411	355,7
	8,729	0,0324	269,4		15,193	0,0413	367,5
	10,490	0,0382	274,7		15,780	0,0380	415,8
C	14,303	0,0316	452,9	M	21,029	0,0243	865,9
	15,184	0,0297	511,5		21,371	0,0202	1058,8
	14,890	0,0297	501,1		22,055	0,0294	749,3
D	16,357	0,0201	815,2	N	29,748	0,0161	1848,4
	16,357	0,0236	692,8		29,748	0,0199	1497,9
	16,357	0,0369	443,2		29,064	0,0194	1494,5
E	16,064	0,0393	408,5	O	31,267	0,0322	971,6
	15,184	0,0390	389,4		32,635	0,0188	1738,6
	15,770	0,0385	409,3		34,002	0,0218	1561,1
F	24,865	0,0308	807,2	P	32,977	0,0233	1417,1
	25,158	0,0201	1254,2		32,635	0,0350	933,1
	24,572	0,0190	1290,3		32,635	0,0330	988,1
G	25,452	0,0318	799,5	Q	18,978	0,0368	515,2
	26,332	0,0363	724,5		19,320	0,0356	543,3
	25,158	0,0294	855,5		20,004	0,0352	568,7
H	12,040	0,0260	463,3	R	4,959	0,0337	147,0
	12,040	0,0448	268,5		4,959	0,0320	155,0
	12,626	0,0292	432,3		4,959	0,0316	157,0
I	30,439	0,0332	916,4	S	36,738	0,0150	2442,9
	33,373	0,0356	937,5		36,738	0,0217	1694,0
	29,559	0,0465	635,4		38,448	0,0263	1461,3
J	33,960	0,0323	1053,0	T	31,629	0,0335	945,5
	34,253	0,0401	854,7		25,132	0,0345	729,2
	37,480	0,0266	1407,5		28,209	0,0135	2095,8

APÊNDICE J-1 – Resultados experimentais do teor de gordura das rações

Tabela 1. Teor de gordura, em %, obtido através de extração a frio, das amostras de ração.

Amostra	massa (g) (valor de C)	balão (g) (valor de B)	balão + óleo (g) (valor de A)	% gordura	Média (%)	DP	CV (%)																																																																																																																																																																																
A	2,024	99,149	99,579	21,2	19,7	2,2	11,3																																																																																																																																																																																
	2,000	102,321	102,683	18,1				B	2,101	124,324	124,634	14,8	14,8	0,1	0,4	2,104	102,126	102,438	14,8	C	2,026	102,302	102,833	26,2	24,9	1,8	7,2	2,019	103,764	104,242	23,7	D	2,027	116,970	117,297	16,1	17,0	1,2	7,3	2,034	121,384	121,748	17,9	E	2,085	126,266	126,573	14,7	14,4	0,5	3,4	2,058	124,225	124,514	14,0	F	2,002	146,656	146,957	15,0	13,6	2,0	14,6	2,014	135,815	136,061	12,2	G	2,003	119,048	119,350	15,1	14,4	0,9	6,2	2,007	115,578	115,855	13,8	H	2,008	105,246	105,543	14,8	15,5	1,0	6,2	2,007	100,080	100,404	16,1	J	2,005	135,872	136,241	18,4	16,8	2,3	13,9	2,013	103,715	104,019	15,1	K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6	2,008	99,984	100,190	10,3	L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5
B	2,101	124,324	124,634	14,8	14,8	0,1	0,4																																																																																																																																																																																
	2,104	102,126	102,438	14,8				C	2,026	102,302	102,833	26,2	24,9	1,8	7,2	2,019	103,764	104,242	23,7	D	2,027	116,970	117,297	16,1	17,0	1,2	7,3	2,034	121,384	121,748	17,9	E	2,085	126,266	126,573	14,7	14,4	0,5	3,4	2,058	124,225	124,514	14,0	F	2,002	146,656	146,957	15,0	13,6	2,0	14,6	2,014	135,815	136,061	12,2	G	2,003	119,048	119,350	15,1	14,4	0,9	6,2	2,007	115,578	115,855	13,8	H	2,008	105,246	105,543	14,8	15,5	1,0	6,2	2,007	100,080	100,404	16,1	J	2,005	135,872	136,241	18,4	16,8	2,3	13,9	2,013	103,715	104,019	15,1	K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6	2,008	99,984	100,190	10,3	L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1								
C	2,026	102,302	102,833	26,2	24,9	1,8	7,2																																																																																																																																																																																
	2,019	103,764	104,242	23,7				D	2,027	116,970	117,297	16,1	17,0	1,2	7,3	2,034	121,384	121,748	17,9	E	2,085	126,266	126,573	14,7	14,4	0,5	3,4	2,058	124,225	124,514	14,0	F	2,002	146,656	146,957	15,0	13,6	2,0	14,6	2,014	135,815	136,061	12,2	G	2,003	119,048	119,350	15,1	14,4	0,9	6,2	2,007	115,578	115,855	13,8	H	2,008	105,246	105,543	14,8	15,5	1,0	6,2	2,007	100,080	100,404	16,1	J	2,005	135,872	136,241	18,4	16,8	2,3	13,9	2,013	103,715	104,019	15,1	K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6	2,008	99,984	100,190	10,3	L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																				
D	2,027	116,970	117,297	16,1	17,0	1,2	7,3																																																																																																																																																																																
	2,034	121,384	121,748	17,9				E	2,085	126,266	126,573	14,7	14,4	0,5	3,4	2,058	124,225	124,514	14,0	F	2,002	146,656	146,957	15,0	13,6	2,0	14,6	2,014	135,815	136,061	12,2	G	2,003	119,048	119,350	15,1	14,4	0,9	6,2	2,007	115,578	115,855	13,8	H	2,008	105,246	105,543	14,8	15,5	1,0	6,2	2,007	100,080	100,404	16,1	J	2,005	135,872	136,241	18,4	16,8	2,3	13,9	2,013	103,715	104,019	15,1	K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6	2,008	99,984	100,190	10,3	L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																
E	2,085	126,266	126,573	14,7	14,4	0,5	3,4																																																																																																																																																																																
	2,058	124,225	124,514	14,0				F	2,002	146,656	146,957	15,0	13,6	2,0	14,6	2,014	135,815	136,061	12,2	G	2,003	119,048	119,350	15,1	14,4	0,9	6,2	2,007	115,578	115,855	13,8	H	2,008	105,246	105,543	14,8	15,5	1,0	6,2	2,007	100,080	100,404	16,1	J	2,005	135,872	136,241	18,4	16,8	2,3	13,9	2,013	103,715	104,019	15,1	K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6	2,008	99,984	100,190	10,3	L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																												
F	2,002	146,656	146,957	15,0	13,6	2,0	14,6																																																																																																																																																																																
	2,014	135,815	136,061	12,2				G	2,003	119,048	119,350	15,1	14,4	0,9	6,2	2,007	115,578	115,855	13,8	H	2,008	105,246	105,543	14,8	15,5	1,0	6,2	2,007	100,080	100,404	16,1	J	2,005	135,872	136,241	18,4	16,8	2,3	13,9	2,013	103,715	104,019	15,1	K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6	2,008	99,984	100,190	10,3	L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																								
G	2,003	119,048	119,350	15,1	14,4	0,9	6,2																																																																																																																																																																																
	2,007	115,578	115,855	13,8				H	2,008	105,246	105,543	14,8	15,5	1,0	6,2	2,007	100,080	100,404	16,1	J	2,005	135,872	136,241	18,4	16,8	2,3	13,9	2,013	103,715	104,019	15,1	K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6	2,008	99,984	100,190	10,3	L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																				
H	2,008	105,246	105,543	14,8	15,5	1,0	6,2																																																																																																																																																																																
	2,007	100,080	100,404	16,1				J	2,005	135,872	136,241	18,4	16,8	2,3	13,9	2,013	103,715	104,019	15,1	K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6	2,008	99,984	100,190	10,3	L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																																
J	2,005	135,872	136,241	18,4	16,8	2,3	13,9																																																																																																																																																																																
	2,013	103,715	104,019	15,1				K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6	2,008	99,984	100,190	10,3	L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																																												
K	2,002	103,684	103,897	10,6	10,4	0,3	2,6																																																																																																																																																																																
	2,008	99,984	100,190	10,3				L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0	2,038	99,122	99,360	11,7	M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																																																								
L	2,039	124,195	124,433	11,7	11,7	0,0	0,0																																																																																																																																																																																
	2,038	99,122	99,360	11,7				M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0	2,009	102,100	102,335	11,7	N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																																																																				
M	2,012	102,410	102,670	12,9	12,3	0,9	7,0																																																																																																																																																																																
	2,009	102,100	102,335	11,7				N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6	2,015	105,907	106,187	13,9	O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																																																																																
N	2,013	105,163	105,445	14,0	14,0	0,1	0,6																																																																																																																																																																																
	2,015	105,907	106,187	13,9				O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8	2,019	118,974	119,291	15,7	P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																																																																																												
O	2,013	108,051	108,330	13,9	14,8	1,3	8,8																																																																																																																																																																																
	2,019	118,974	119,291	15,7				P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7	2,012	126,112	126,455	17,0	Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																																																																																																								
P	2,009	100,153	100,581	21,3	19,2	3,0	15,7																																																																																																																																																																																
	2,012	126,112	126,455	17,0				Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																																																																																																																				
Q	2,007	126,085	126,420	16,7	16,9	0,3	1,5																																																																																																																																																																																
	2,005	100,051	100,393	17,1																																																																																																																																																																																			

R	2,014	104,500	104,824	16,1	16,3	0,3	1,8
	2,013	102,363	102,695	16,5			
S	2,010	102,684	102,998	15,6	14,5	1,5	10,5
	2,014	105,857	106,128	13,5			

APÊNDICE J-2 – Resultados experimentais de %AGL das amostras de ração

1 Reagentes do *kit* AciSafe™ MSA

- calibradores: lote 2006003 / 2007003 / 2008003 / 2009003 / 2010003 (1 a 5, respectivamente) - validade: out./2004;
- reagente A: lote 20400002 / 4310003 – validade: nov./2005;
- reagente B: lote 4331002 – validade: nov./2004;
- controles MSA: 20286002 / 2026002 / ilegível (*low*, *medium* e *high*, respectivamente) – validade: out./2004; e,
- reagente de preparação: 2036002 – validade: nov./2003.

2 Amostras utilizadas

Tabela 1. Amostras utilizadas para correlação do *kit* AciSafe™ MSA.

Amostra	Descrição do produto	Data de Fabricação
A	À base de Carne	11/03/2003
B	À base de Carne	24/06/2003
C	À base de Carne	21/12/2003
D	À base de Carne	2/07/2003
E	À base de Carne	27/07/2003
F	Á base de Carne	30/11/2003
G	À base de Frango	30/07/2003
H	À base de Frango	31/08/2003
J	À base de Peixe	24/06/2003
K	À base de Peixe	1/08/2003
L	À base de Peixe	14/12/2003
M	Para animais novos	24/06/2003
N	Para animais novos	7/07/2003
O	Para animais novos	16/12/2003
P	Para animais adultos	23/06/2003
Q	Para animais adultos	05/07/2003
R	Para animais adultos	19/12/2003
S	À base de Frango	27/8/2002

3 Análises com o *kit* AciSafe™ MSA

3.1 Curva de calibração 1: amostras A a H

Tabela 2. Curva de calibração 1 para o *kit* AciSafe™ MSA, amostras A a H.

Conc. (nmol/kg)	Absorbância
0,02	0,831
0,28	0,438
0,68	0,259
1,07	0,182

3.1.1 Teste dos controles

Tabela 3. Teste dos controles MSA para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorbância	Conc. (% ácido oléico)	Conc. Média (% ácido oléico)	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,307	0,5049	0,4932	3,3	0,3-0,5
	0,309	0,5001			
	0,320	0,4746			
<i>medium</i>	0,215	0,8522	0,8517	4,3	0,7-0,9
	0,223	0,8153			
	0,209	0,8877			
<i>high</i>	0,148	1,5586	1,6503	5,7	1,4-1,7
	0,140	1,7469			
	0,144	1,6455			

3.2 Curva de calibração 2: amostras J a S

Tabela 4. Curva de calibração 2 para o *kit* AciSafe™ MSA, amostras J a S.

Conc. (nmol/kg)	Absorbância
0,02	0,692
0,28	0,417
0,68	0,256
1,07	0,186

3.2.1 Teste do controle

Tabela 5. Teste dos controles MSA para a Curva de calibração 2.

Controle	Absorbância	Conc. (% ácido oléico)	Conc. Média (% ácido oléico)	CV (%)	Referência
Low	0,319	0,4646	0,4786	2,8	0,3-0,5
	0,309	0,4908			
	0,313	0,4803			
medium	0,215	0,8596	0,8524	1,5	0,7-0,9
	0,219	0,8379			
	0,215	0,8596			
high	0,145	1,672	1,6729	0,9	1,4-1,7
	0,146	1,6578			
	0,145	1,6888			

3.3 Amostras: % AGL em relação à massa de ração

Tabela 6. Resultados experimentais com o *kit* AciSafe™ MSA.

Amostra	%AGL (% ác. Oléico)	Diluição	%AGL Final (% ác. Oléico)	%AGL Média (% ác. oléico)	DP	CV (%)
A	0,2544	5,0	1,2720	1,2280	0,0582	4,7
	0,2324	5,0	1,1620			
	0,2500	5,0	1,2500			
B	0,5862	4,0	2,3448	2,4848	0,1265	5,1
	0,6297	4,0	2,5188			
	0,6477	4,0	2,5908			
C	0,2679	4,0	1,0716	1,0649	0,0444	4,2
	0,2544	4,0	1,0176			
	0,2764	4,0	1,1056			
D	0,2555	4,0	1,0220	0,9808	0,0445	4,5
	0,2334	4,0	0,9336			
	0,2467	4,0	0,9868			
E	0,2195	4,0	0,8780	0,8448	0,0417	4,9
	0,2146	4,0	0,8584			
	0,1995	4,0	0,7980			
F	0,4810	4,0	1,9240	2,0433	0,1594	7,8
	0,5561	4,0	2,2244			
	0,4954	4,0	1,9816			
G	0,2302	4,0	0,9208	0,9241	0,0095	1,0
	0,2292	4,0	0,9168			

	0,2337	4,0	0,9348			
	0,2166	4,0	0,8664			
H	0,2292	4,0	0,9168	0,8784	0,0340	3,9
	0,2130	4,0	0,8520			
	0,6203	4,0	2,4812			
J	0,6134	4,0	2,4536	2,3848	0,1437	6,0
	0,5549	4,0	2,2196			
	0,2758	4,0	1,1032			
K	0,2543	4,0	1,0172	1,0431	0,0522	5,0
	0,2522	4,0	1,0088			
	0,3309	4,0	1,3236			
L	0,2913	4,0	1,1652	1,2860	0,1071	8,3
	0,3423	4,0	1,3692			
	0,2644	4,0	1,0576			
M	0,2535	4,0	1,0140	1,0275	0,0261	2,5
	0,2527	4,0	1,0108			
	0,2468	3,0	0,7404			
N	0,2285	3,0	0,6855	0,7125	0,0275	3,9
	0,2372	3,0	0,7116			
	0,514	4,0	2,0572			
O	0,512	4,0	2,0488	2,1220	0,1196	5,6
	0,565	4,0	2,2600			
	0,2026	4,0	0,8104			
P	0,1952	4,0	0,7808	0,8053	0,0224	2,8
	0,2062	4,0	0,8248			
	0,2154	4,0	0,8616			
Q	0,1905	4,0	0,7620	0,8291	0,0581	7,0
	0,2159	4,0	0,8636			
	0,2372	4,0	0,9488			
R	0,2091	4,0	0,8364	0,9061	0,0609	6,7
	0,2333	4,0	0,9332			
	0,2416	4,0	0,9664			
S	0,2628	4,0	1,0512	1,0151	0,0438	4,3
	0,2569	4,0	1,0276			

3.4 Amostras: % AGL em relação ao teor de óleo da amostra

Tabela 7. Resultados experimentais com o *kit* AciSafe™ MSA, em base lipídica.

Amostra	%AGL (ác. Oleico / kg ração)	% gordura	%AGL (ác. Oleico / kg gordura)
A	1,2720	19,7	6,4659
	1,1620	19,7	5,9067
	1,2500	19,7	6,3540
B	2,3448	14,8	15,8519
	2,5188	14,8	17,0283
	2,5908	14,8	17,5150
C	1,0716	24,9	4,2963
	1,0176	24,9	4,0798
	1,1056	24,9	4,4327
D	1,0220	17,0	6,0068
	0,9336	17,0	5,4872
	0,9868	17,0	5,7999
E	0,8780	14,4	6,1042
	0,8584	14,4	5,9680
	0,7980	14,4	5,5480
F	1,9240	13,6	14,1214
	2,2244	13,6	16,3262
	1,9816	13,6	14,5441
G	0,9208	14,4	6,3769
	0,9168	14,4	6,3492
	0,9348	14,4	6,4739
H	0,8664	15,5	5,6015
	0,9168	15,5	5,9274
	0,8520	15,5	5,5084
J	2,4812	16,8	14,8106
	2,4536	16,8	14,6458
	2,2196	16,8	13,2490
K	1,1032	10,4	10,5578
	1,0172	10,4	9,7348
	1,0088	10,4	9,6544
L	1,3236	11,7	11,3368
	1,1652	11,7	9,9801
	1,3692	11,7	11,7274
M	1,0576	12,3	8,5914
	1,0140	12,3	8,2373
	1,0108	12,3	8,2113

N	0,7404	14,0	5,3066
	0,6855	14,0	4,9131
O	0,7116	14,0	5,1002
	2,0572	14,8	13,9185
	2,0488	14,8	13,8616
	2,2600	14,8	15,2905
P	0,8104	19,2	4,2261
	0,7808	19,2	4,0718
	0,8248	19,2	4,3012
Q	0,8616	16,9	5,1059
	0,7620	16,9	4,5157
	0,8636	16,9	5,1178
R	0,9488	16,3	5,8244
	0,8364	16,3	5,1344
	0,9332	16,3	5,7286
S	0,9664	14,5	6,6470
	1,0512	14,5	7,2303
	1,0276	14,5	7,0680

4 AGL, segundo AOCS

Tabela 8. Resultados experimentais de %AGL pelo método oficial modificado.

Amostra	massa (g)	N	Vgasto (mL)	% AGL	%AGL médio	DP	CV (%)
A	0,2064	0,0431	0,80	4,7109	4,7491	0,0641	1,3
	0,2016	0,0431	0,80	4,8231			
	0,2063	0,0431	0,80	4,7132			
B	0,2111	0,0431	3,56	20,4969	20,7515	0,2229	1,1
	0,1918	0,0431	3,30	20,9118			
	0,2099	0,0431	3,60	20,8457			
C	0,2057	0,0431	1,27	7,5041	7,4527	0,1644	2,2
	0,2040	0,0431	1,22	7,2687			
	0,2051	0,0431	1,28	7,5853			
D	0,2086	0,0431	0,97	5,6518	5,8014	0,2064	3,6
	0,2114	0,0431	1,05	6,0369			
	0,2084	0,0431	0,98	5,7155			
E	0,2166	0,0431	0,81	4,5452	4,5835	0,0814	1,8
	0,2013	0,0431	0,75	4,5284			
	0,2053	0,0431	0,79	4,6770			
F	0,2061	0,0431	3,40	20,0506	20,1299	0,0713	0,4
	0,2077	0,0431	3,45	20,1887			

	0,2087	0,0431	3,46	20,1502			
	0,2031	0,0431	0,96	5,7450			
G	0,2060	0,0431	1,00	5,9001	5,7605	0,1325	2,3
	0,2221	0,0431	1,03	5,6366			
	0,2107	0,0431	0,80	4,6148			
H	0,2031	0,0431	0,82	4,9072	4,7642	0,1463	3,1
	0,2191	0,0431	0,86	4,7707			
	0,2132	0,0453	4,05	24,2817			
J	0,2127	0,0453	4,00	24,0383	24,2490	0,1965	0,8
	0,2135	0,0453	4,08	24,4272			
	0,2071	0,0453	1,62	9,9987			
K	0,2187	0,0453	1,71	9,9944	10,0432	0,0808	0,8
	0,2459	0,0453	1,95	10,1365			
	0,2198	0,0453	1,10	6,3970			
L	0,2023	0,0453	1,05	6,6344	6,5741	0,1559	2,4
	0,2197	0,0453	1,15	6,6908			
	0,2074	0,0453	1,65	10,1692			
M	0,2048	0,0453	1,65	10,2983	10,3830	0,2665	2,6
	0,2154	0,0453	1,80	10,6816			
	0,2093	0,0453	1,20	7,3286			
N	0,2086	0,0453	1,22	7,4758	7,6094	0,3663	4,8
	0,2071	0,0453	1,30	8,0237			
	0,2029	0,0453	4,40	27,7192			
O	0,1989	0,0453	4,46	28,6623	27,9875	0,5885	2,1
	0,2016	0,0453	4,35	27,5810			
	0,2243	0,0453	0,95	5,4138			
P	0,2108	0,0453	0,85	5,1542	5,1986	0,1968	3,8
	0,2161	0,0453	0,85	5,0278			
	0,2216	0,0453	0,87	5,0183			
Q	0,2019	0,0453	0,84	5,3181	5,1833	0,1521	2,9
	0,2084	0,0453	0,85	5,2135			
	0,2147	0,0453	1,02	6,0727			
R	0,2051	0,0453	0,97	6,0453	6,0780	0,0356	0,6
	0,2090	0,0453	1,00	6,1160			
	0,2181	0,0453	0,98	5,7240			
S	0,2064	0,0453	0,97	5,9866	5,7854	0,1786	3,1
	0,2166	0,0453	0,96	5,6456			

5 Diferenças entre as metodologias

Tabela 9. Tabela comparativa dos resultados experimentais de %AGL, obtidos pelo kit *AciSafe*TM MSA e pelo método oficial modificado.

Amostra	%AGL (<i>kit</i>)	%AGL (AOCS)	Diferença (%)	Relação AOCS/ <i>kit</i>
A	6,4659	4,7109	37,3	0,7
	5,9067	4,8231	22,5	0,8
	6,3540	4,7132	34,8	0,7
B	15,8519	20,4969	-22,7	1,3
	17,0283	20,9118	-18,6	1,2
	17,5150	20,8457	-16,0	1,2
C	4,2963	7,5041	-42,7	1,7
	4,0798	7,2687	-43,9	1,8
	4,4327	7,5853	-41,6	1,7
D	6,0068	5,6518	6,3	0,9
	5,4872	6,0369	-9,1	1,1
	5,7999	5,7155	1,5	1,0
E	6,1042	4,5452	34,3	0,7
	5,9680	4,5284	31,8	0,8
	5,5480	4,6770	18,6	0,8
F	14,1214	20,0506	-29,6	1,4
	16,3262	20,1887	-19,1	1,2
	14,5441	20,1502	-27,8	1,4
G	6,3769	5,7450	11,0	0,9
	6,3492	5,9001	7,6	0,9
	6,4739	5,6366	14,9	0,9
H	5,6015	4,6148	21,4	0,8
	5,9274	4,9072	20,8	0,8
	5,5084	4,7707	15,5	0,9
J	14,8106	24,2817	-39,0	1,6
	14,6458	24,0383	-39,1	1,6
	13,2490	24,4272	-45,8	1,8
K	10,5578	9,9987	5,6	0,9
	9,7348	9,9944	-2,6	1,0
	9,6544	10,1365	-4,8	1,0
L	11,3368	6,3970	77,2	0,6
	9,9801	6,6344	50,4	0,7
	11,7274	6,6908	75,3	0,6

	8,5914	10,1692	-15,5	1,2
M	8,2373	10,2983	-20,0	1,3
	8,2113	10,6816	-23,1	1,3
	5,3066	7,3286	-27,6	1,4
N	4,9131	7,4758	-34,3	1,5
	5,1002	8,0237	-36,4	1,6
	13,9185	27,7192	-49,8	2,0
O	13,8616	28,6623	-51,6	2,1
	15,2905	27,5810	-44,6	1,8
	4,2261	5,4138	-21,9	1,3
P	4,0718	5,1542	-21,0	1,3
	4,3012	5,0278	-14,5	1,2
	5,1059	5,0183	1,7	1,0
Q	4,5157	5,3181	-15,1	1,2
	5,1178	5,2135	-1,8	1,0
	5,8244	6,0727	-4,1	1,0
R	5,1344	6,0453	-15,1	1,2
	5,7286	6,1160	-6,3	1,1
	6,6470	5,7240	16,1	0,9
S	7,2303	5,9866	20,8	0,8
	7,0680	5,6456	25,2	0,8

APÊNDICE J-3 – Resultados experimentais de IP das amostras de ração

1 Reagentes do *kit PeroxySafe*TM MSA

- calibradores: lote 2029002 / 2031002 / 2032002 / 2033002 (1 a 4, respectivamente)
- validade: out./2004;
- reagente A: lote 4300004 – validade: jun./2004;
- reagente B: lote 4301005 – validade: jun./2004;
- reagente C: 55000P / lote RD. Br – validade: 30/12/2004
- controles MSA: 20286002 / 2026002 / ilegível (*low, medium e high*, respectivamente) – validade: out./2004; e,
- reagente de preparação: 2036002 – validade: nov./2005.

2 Amostras utilizadas

Mesmas amostras utilizadas para o *kit AciSafe*TM MSA.

3 Análises com o *kit PeroxySafe*TM MSA

3.1 Curva de calibração 1: amostras A a H, K

Equação: $y = 0,838 x - 0,002$; $r = 0,9986$

Reagente branco = 0,083 A

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o *kit PeroxySafe*TM MSA, amostras A a H, K.

Conc. (meq/kg)	Absorbância	Diferença (%)
0,038	0,05	-6,5
0,086	0,100	4,4
0,165	0,200	-0,8

3.1.1 Teste dos controles

Apesar do valor de CV do controle *low* ter sido superior a 10%, todos os valores de concentração encontrados estavam na faixa de aceitação (Tabela 2). Quanto ao controle *medium*, apresentou diferença relativa com o limite inferior da faixa de aceitação de 19,2%. Embora essa diferença seja relativamente elevada, em testes anteriores, não foi possível obter uma curva de calibração melhor e prosseguiu-se, então, com os teste com amostras.

Tabela 2. Teste dos controles MSA para a Curva de calibração 1.

Controle	Absorbância	Conc. (meq/kg)	Conc. Média (meq/kg)	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,032	0,0399	0,0493	26,6	0,03-0,05
	0,035	0,0438			
	0,052	0,0643			
<i>medium</i>	0,041	0,0509	0,0525	3,0	0,065-0,085
	0,044	0,0541			
	0,042	0,0525			
<i>high</i>	0,118	0,1432	0,1416	2,4	0,14-0,16
	0,119	0,1440			
	0,114	0,1377			

3.2 Curva de calibração 2: amostras J, L a S

Equação: $y = 0,643 x + 0,015$; $r = 1,0000$

Reagente Branco = 0,080 A

Tabela 3. Curva de calibração 2 para o *kit PeroxySafe*TM MSA, amostras J, L a S.

Conc. (meq/kg)	Absorbância	Diferença (%)
0,047	0,05	-0,3
0,079	0,100	0,2
0,143	0,200	0,0
0,047	0,05	-0,3

3.2.1 Teste dos controles

Embora os controles *medium* e *high* tenham apresentado valores de concentração média fora dos respectivos intervalos de referência e o valor de CV para o controle *low* tenha sido superior a 10%, a curva de calibração foi aceita (Tabela 4). O controle *medium* já havia apresentado valor médio inferior a essa faixa (item 2.1.1). Já a diferença relativa entre o valor médio da concentração do controle *high* e o limite superior do intervalo de referência foi tolerável (13,2%).

Tabela 4. Teste dos controles MSA para a Curva de calibração 2.

Controle	Absorbância	Conc. (meq/kg)	Conc. Média (meq/kg)	CV (%)	Referência
LOW	0,045	0,0468	0,0412	19,4	0,03-0,05
	0,032	0,0272			
	0,038	0,0355			
	0,038	0,0365			
Medium	0,046	0,0488	0,0463	7,8	0,065-0,085
	0,043	0,0437			
	0,124	0,1691			
high	0,144	0,2010	0,1811	9,6	0,14-0,16
	0,126	0,1732			

3.3 Amostras: em relação à massa de ração

Tabela 5. Resultados experimentais com o *kit PeroxySafe™* MSA.

Amostra	IP (meq/kg)	Diluição	IP final (meq/kg)	IP Médio (meq/kg)	DP	CV (%)
A	0,1653	3,0	0,4959	0,4905	0,0048	1,0
	0,1622	3,0	0,4866			
	0,1630	3,0	0,4890			
	0,0627	3,0	0,1881			
B	0,0706	3,0	0,2118	0,2087	0,0192	9,2
	0,0754	3,0	0,2262			
	0,1606	2,0	0,3212			
C	0,1574	2,0	0,3148	0,3269	0,0158	4,8
	0,1724	2,0	0,3448			
	0,0343	3,0	0,1029			
D	0,0383	3,0	0,1149	0,1109	0,0069	6,2
	0,0383	3,0	0,1149			

	0,0485	3,0	0,1455			
E	0,0422	3,0	0,1266	0,1321	0,0117	8,8
	0,0414	3,0	0,1242			
	0,0328	3,0	0,0984			
F	0,0328	3,0	0,0984	0,1031	0,0081	7,9
	0,0375	3,0	0,1125			
	0,0296	3,0	0,0888			
G	0,0280	3,0	0,0840	0,0872	0,0028	3,2
	0,0296	3,0	0,0888			
	0,0320	3,0	0,0960			
H	0,0343	3,0	0,1029	0,0975	0,0048	5,0
	0,0312	3,0	0,0936			
	0,0509	3,0	0,1527			
K	0,0533	3,0	0,1599	0,1646	0,0148	9,0
	0,0604	3,0	0,1812			
	0,0139	3,0	0,0417			
J	0,0149	3,0	0,0447	0,0437	0,0017	4,0
	0,0149	3,0	0,0447			
	0,0283	3,0	0,0849			
L	0,0283	3,0	0,0849	0,0849	0,0000	0,0
	0,0283	3,0	0,0849			
	0,0252	3,0	0,0756			
M	0,0211	3,0	0,0633	0,0694	0,0062	8,9
	0,0231	3,0	0,0693			
	0,0560	3,0	0,1680			
N	0,0488	3,0	0,1464	0,1567	0,0108	6,9
	0,0519	3,0	0,1557			
	0,0344	3,0	0,1032			
O	0,0314	3,0	0,0942	0,0982	0,0046	4,7
	0,0324	3,0	0,0972			
	0,0951	3,0	0,2853			
P	0,0992	3,0	0,2976	0,2925	0,0064	2,2
	0,0982	3,0	0,2946			
	0,1568	3,0	0,4704			
Q	0,1629	3,0	0,4887	0,4857	0,0140	2,9
	0,1660	3,0	0,4980			
	0,1321	3,0	0,3963			
R	0,1362	3,0	0,4086	0,4045	0,0071	1,8
	0,1362	3,0	0,4086			
	0,0406	3,0	0,1218			
S	0,0396	3,0	0,1188	0,1208	0,0017	1,4
	0,0406	3,0	0,1218			

3.4 Amostras: em relação ao teor de óleo da amostra

Tabela 6. Resultados experimentais com o *kit* PeroxySafe™ MSA, em base lipídica.

Amostra	Índice de peróxidos (meq/kg ração)	% óleo	Índice de peróxidos (meq/kg óleo)
A	0,4959	19,7	2,5208
	0,4866	19,7	2,4735
	0,4890	19,7	2,4857
B	0,1881	14,8	1,2716
	0,2118	14,8	1,4319
	0,2262	14,8	1,5292
C	0,3212	24,9	1,2878
	0,3148	24,9	1,2621
	0,3448	24,9	1,3824
D	0,1029	17,0	0,6048
	0,1149	17,0	0,6753
	0,1149	17,0	0,6753
E	0,1455	14,4	1,0116
	0,1266	14,4	0,8802
	0,1242	14,4	0,8635
F	0,0984	13,6	0,7222
	0,0984	13,6	0,7222
	0,1125	13,6	0,8257
G	0,0888	14,4	0,6150
	0,0840	14,4	0,5817
	0,0888	14,4	0,6150
H	0,0960	15,5	0,6207
	0,1029	15,5	0,6653
	0,0936	15,5	0,6052
J	0,1527	16,8	0,9115
	0,1599	16,8	0,9545
	0,1812	16,8	1,0816
K	0,0417	10,4	0,3991
	0,0447	10,4	0,4278
	0,0447	10,4	0,4278
L	0,0849	11,7	0,7272
	0,0849	11,7	0,7272
	0,0849	11,7	0,7272
M	0,0756	12,3	0,6141

	0,0633	12,3	0,5142
	0,0693	12,3	0,5630
	0,1680	14,0	1,2041
N	0,1464	14,0	1,0493
	0,1557	14,0	1,1159
	0,1032	14,8	0,6982
O	0,0942	14,8	0,6373
	0,0972	14,8	0,6576
	0,2853	19,2	1,4878
P	0,2976	19,2	1,5519
	0,2946	19,2	1,5363
	0,4704	16,9	2,7876
Q	0,4887	16,9	2,8961
	0,4980	16,9	2,9512
	0,3963	16,3	2,4328
R	0,4086	16,3	2,5083
	0,4086	16,3	2,5083
	0,1218	14,5	0,8378
S	0,1188	14,5	0,8171
	0,1218	14,5	0,8378

4 Índice de peróxidos, segundo o método oficial modificado

Tabela 7. Resultados experimentais de IP pelo método oficial modificado.

Amostra	Normalidade	V(mL)	Massa (g)	IP (meq/kg)	IP médio (meq/kg)	DP	CV (%)
	0,0008	1,25	0,2103	4,9616			
A	0,0008	1,30	0,2026	5,3561	5,2568	0,2602	5,0
	0,0008	1,33	0,2036	5,4528			
	0,0008	1,03	0,2117	4,0613			
B	0,0008	1,15	0,2150	4,4648	4,5645	0,5597	12,3
	0,0008	1,30	0,2100	5,1674			
	0,0008	0,72	0,2134	2,8163			
C	0,0008	0,75	0,2211	2,8315	2,8915	0,1172	4,1
	0,0008	0,81	0,2234	3,0266			
	0,0008	0,38	0,2046	1,5503			
D	0,0008	0,40	0,2059	1,6216	1,5932	0,0378	2,4
	0,0008	0,40	0,2077	1,6076			
E	0,0008	1,13	0,2037	4,6306	4,6685	0,0443	0,9

	0,0008	1,15	0,2061	4,6576			
	0,0008	1,15	0,2035	4,7172			
	0,0008	0,40	0,1975	1,6906			
F	0,0008	0,45	0,2056	1,8270	1,7980	0,0962	5,3
	0,0008	0,45	0,2002	1,8763			
	0,0008	0,50	0,2089	1,9979			
G	0,0008	0,55	0,2115	2,1707	2,1162	0,1025	4,8
	0,0008	0,55	0,2106	2,1800			
	0,0008	0,45	0,2097	1,7913			
H	0,0008	0,40	0,2050	1,6287	1,6840	0,0929	5,5
	0,0008	0,40	0,2046	1,6319			
	0,0009	0,55	0,2035	2,4254			
J	0,0009	0,55	0,2043	2,4159	2,4380	0,0304	1,2
	0,0009	0,58	0,2105	2,4726			
	0,0008	1,66	0,2160	6,4151			
K	0,0008	1,85	0,2182	7,0772	6,7657	0,3328	4,9
	0,0008	1,80	0,2208	6,8049			
	0,0009	0,65	0,2174	2,6831			
L	0,0009	0,65	0,2105	2,7711	2,8778	0,2647	9,2
	0,0009	0,75	0,2117	3,1793			
	0,0009	0,40	0,2190	1,6391			
M	0,0009	0,35	0,2137	1,4698	1,6072	0,1245	7,7
	0,0009	0,40	0,2096	1,7126			
	0,0009	0,40	0,2118	1,6948			
N	0,0009	0,52	0,2146	2,1745	1,8593	0,2731	14,7
	0,0009	0,40	0,2101	1,7085			
	0,0009	0,42	0,2007	1,8780			
O	0,0009	0,52	0,2103	2,2190	2,0813	0,1797	8,6
	0,0009	0,50	0,2090	2,1469			
	0,0009	0,30	0,2040	1,3197			
P	0,0009	0,34	0,2080	1,4669	1,4322	0,0998	7,0
	0,0009	0,35	0,2080	1,5100			
	0,0009	0,42	0,2011	1,8742			
Q	0,0009	0,45	0,2033	1,9864	1,9477	0,0636	3,3
	0,0009	0,45	0,2037	1,9825			
	0,0009	1,00	0,2074	4,3269			
R	0,0009	1,06	0,2104	4,5211	4,3393	0,1759	4,1
	0,0009	0,96	0,2066	4,1699			
	0,0009	0,60	0,2010	2,6788			
S	0,0009	0,62	0,2098	2,6520	2,7122	0,0821	3,0
	0,0009	0,66	0,2111	2,8057			

5 Diferenças entre as metodologias

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de IP, em base lipídica, obtidos pelo *kit* PeroxySafe™ MSA e pelo método oficial modificado.

Amostra	Kit (meq/kg óleo)	AOCS (meq/kg óleo)	Diferença (%)
A	2,5208	4,9616	-49,2
	2,4735	5,3561	-53,8
	2,4857	5,4528	-54,4
B	1,2716	4,0613	-68,7
	1,4319	4,4648	-67,9
	1,5292	5,1674	-70,4
C	1,2878	2,8163	-54,3
	1,2621	2,8315	-55,4
	1,3824	3,0266	-54,3
D	0,6048	1,5503	-61,0
	0,6753	1,6216	-58,4
	0,6753	1,6076	-58,0
E	1,0116	4,6306	-78,2
	0,8802	4,6576	-81,1
	0,8635	4,7172	-81,7
F	0,7222	1,6906	-57,3
	0,7222	1,8270	-60,5
	0,8257	1,8763	-56,0
G	0,6150	1,9979	-69,2
	0,5817	2,1707	-73,2
	0,6150	2,1800	-71,8
H	0,6207	1,7913	-65,4
	0,6653	1,6287	-59,2
	0,6052	1,6319	-62,9
J	0,9115	6,4151	-85,8
	0,9545	7,0772	-86,5
	1,0816	6,8049	-84,1
K	0,3991	2,4254	-83,5
	0,4278	2,4159	-82,3
	0,4278	2,4726	-82,7
L	0,7272	2,6831	-72,9
	0,7272	2,7711	-73,8
	0,7272	3,1793	-77,1
M	0,6141	1,6391	-62,5
	0,5142	1,4698	-65,0

	0,5630	1,7126	-67,1
	1,2041	1,6948	-29,0
N	1,0493	2,1745	-51,7
	1,1159	1,7085	-34,7
	0,6982	1,8780	-62,8
O	0,6373	2,2190	-71,3
	0,6576	2,1469	-69,4
	1,4878	1,3197	12,7
P	1,5519	1,4669	5,8
	1,5363	1,5100	1,7
	2,7876	1,8742	48,7
Q	2,8961	1,9864	45,8
	2,9512	1,9825	48,9
	2,4328	4,3269	-43,8
R	2,5083	4,5211	-44,5
	2,5083	4,1699	-39,8
	0,8378	2,6788	-68,7
S	0,8171	2,6520	-69,2
	0,8378	2,8057	-70,1

APÊNDICE J-4 – Resultados experimentais de concentração de alquenais e p-anisidina das amostras de ração

1 Reagentes do *kit* AlkalSafe™ STD

- calibradores: lote 4321002 / 4322002 / 4323002 / 4324002 (1 a 4, respectivamente)
- validade: maio/2004;
- reagente A: lote 4319003 – validade: mar./2004;
- reagente B: 550010P / lote 4309004 – validade: 31/05/2005;
- controle AlkalSafe™ STD: 550200B - lote 2034003 nov./2004; e,
reagente de preparação: 550001P / lote RD. Br – validade: 30/12/2004.

2 Amostras utilizadas

Mesmas amostras utilizadas para o *kit* AciSafe™ MSA.

3 Análises com o *kit* AlkalSafe™ STD

3.1 Curva de calibração 1: amostras A a L

Equação: $y = 0,001 x - 0,004$; $r = 0,9994$

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o *kit* AlkalSafe™ STD, amostras A a L.

Conc. (nmol/kg)	Absorbância	Diferença (%)
8	0,008	3,8
12	0,019	2,0
32	0,040	-3,4
64	0,087	0,6

3.1.1 Teste do controle

O controle não estava na faixa predita de 14 a 18 nmol/kg e o valor obtido foi próximo ao obtido no Apêndice I-1, onde foi utilizado o mesmo *kit*.

Tabela 2. Teste do controle AlkalSafe™ STD para a Curva de calibração 1.

Absorbância	Conc. (nmol/kg)	Conc. Média (nmol/kg)	DP	CV (%)
0,001	3,1353			
0,001	3,1353	3,292	0,272	8,3
0,001	3,6065			

3.2 Curva de calibração 2: amostras M a S

Equação: $y = 0,001 x - 0,003$; $r = 0,9998$

Tabela 3. Curva de calibração 2 para o kit AlkalSafe™ STD, amostras M a S.

Conc. (nmol/kg)	Absorbância	Diferença (%)
8	0,008	-1,7
12	0,020	3,2
32	0,040	-1,8
64	0,085	0,3

3.2.1 Teste do controle

A concentração média obtida para o controle AlkalSafe™ STD fora da faixa predita (Tabela 4).

Tabela 4. Teste do controle AlkalSafe™ STD para a Curva de calibração 2.

Absorbância	Conc. (nmol/kg)	Conc. média	DP	CV (%)
0,003	4,0167			
0,003	4,0167	4,658	1,111	23,9
0,005	5,9416			

3.3 Amostras: em relação à massa de ração

Tabela 5. Resultados experimentais com o *kit* AlkalSafe™ STD.

Amostra	Conc. (nmol/kg)	Diluição	Conc. Final (nmol/kg)	Conc. Média (nmol/kg)	DP	CV (%)
A	13,790	2,5	34,475	31,733	2,446	7,7
	12,380	2,5	30,950			
	11,910	2,5	29,775			
B	10,971	2,5	27,428	28,209	2,446	8,7
	10,500	2,5	26,250			
	12,380	2,5	30,950			
C	10,031	2,5	25,078	26,252	2,034	7,7
	10,031	2,5	25,078			
	11,440	2,5	28,600			
D	8,1513	2,5	20,378	21,161	1,356	6,4
	9,0910	2,5	22,728			
	8,1513	2,5	20,378			
E	8,1513	2,5	20,378	21,944	1,794	8,2
	8,6211	2,5	21,553			
	9,5608	2,5	23,902			
F	12,380	2,5	30,950	32,125	2,035	6,3
	13,790	2,5	34,475			
	12,380	2,5	30,950			
G	9,5608	2,5	23,902	25,077	2,035	8,1
	9,5608	2,5	23,902			
	10,971	2,5	27,428			
H	10,031	2,5	25,078	25,861	1,357	5,2
	10,031	2,5	25,078			
	10,971	2,5	27,428			
J	15,669	2,5	39,173	39,173	0,000	0,0
	15,669	2,5	39,173			
	15,669	2,5	39,173			
K	14,259	2,5	35,648	37,998	2,035	5,4
	15,669	2,5	39,173			
	15,669	2,5	39,173			
L	13,320	2,5	33,300	33,300	0,000	0,0
	13,320	2,5	33,300			
	13,320	2,5	33,300			
M*	6,4227	2,5	16,057	17,260	2,083	12,1
	7,8661	2,5	19,665			
	6,4227	2,5	16,057			

N*	2,5732	2,5	6,433			
	3,5356	2,5	8,839	7,636	1,203	15,8
	3,0545	2,5	7,636			
	10,272	2,5	25,680			
O	10,753	2,5	26,882	27,283	1,837	6,7
	11,715	2,5	29,287			
	4,9792	2,5	12,448			
P*	2,5732	2,5	6,4330	10,042	3,183	31,7
	4,4977	2,5	11,244			
	5,9416	2,5	14,854			
Q*	5,4603	2,5	13,651	12,849	2,504	19,5
	4,0167	2,5	10,042			
	4,4977	2,5	11,244			
R*	6,4227	2,5	16,057	12,848	2,778	21,6
	4,4977	2,5	11,244			
	2,0921	2,5	5,230			
S*	3,0545	2,5	7,636	6,834	1,389	20,3
	3,0545	2,5	7,636			

*abaixo do limite de detecção do *kit*.

3.4 Amostras: em relação ao teor de óleo da amostra

Tabela 6. Resultados experimentais com o *kit* AlkalSafe™ STD, em base lipídica.

Amostra	Conc. alquenais (nmol/kg ração)	% óleo	Conc. alquenais (nmol/kg óleo)
A	34,4750	19,7	175,2444
	30,9500	19,7	157,3260
	29,7750	19,7	151,3532
B	27,4275	14,8	185,4226
	26,2500	14,8	177,4621
	30,9500	14,8	209,2363
C	25,0775	24,9	100,5425
	25,0775	24,9	100,5425
	28,6000	24,9	114,6652
D	20,3783	17,0	119,7735
	22,7275	17,0	133,5812
	20,3783	17,0	119,7735
E	20,3783	14,4	141,6781
	21,5528	14,4	149,8437
	23,9020	14,4	166,1766

F	30,9500	13,6	227,1604
	34,4750	13,6	253,0325
G	30,9500	13,6	227,1604
	23,9020	14,4	165,5316
	23,9020	14,4	165,5316
H	27,4275	14,4	189,9472
	25,0775	15,5	162,1338
	25,0775	15,5	162,1338
J	27,4275	15,5	177,3272
	39,1725	16,8	233,8250
	39,1725	16,8	233,8250
K	39,1725	16,8	233,8250
	35,6475	10,4	341,1517
	39,1725	10,4	374,8865
L	39,1725	10,4	374,8865
	33,3000	11,7	285,2187
	33,3000	11,7	285,2187
O	33,3000	11,7	285,2187
	25,6800	14,8	173,7439
	26,8825	14,8	181,8797
	29,2875	14,8	198,1512

4 Teste de p-anisidina, segundo AOCS

Tabela 7. Resultados experimentais de p-anisidina.

Amostra	Massa (g)	Ab	Am	Abranco	As	p-anisidina	Média	DP	CV (%)
A	0,3195	0,410	0,312	0,010	0,302	-3,7	-3,2	1,7	-51,3
	0,3195	0,410	0,337	0,010	0,327	-1,4			
	0,3195	0,410	0,303	0,010	0,293	-4,6			
B	0,2127	0,250	0,308	0,080	0,228	2,8	5,6	2,6	45,4
	0,2127	0,250	0,343	0,080	0,263	7,7			
	0,2127	0,250	0,334	0,080	0,254	6,4			
C	0,2482	0,415	0,501	0,186	0,315	-3,7	0,5	4,5	971,0
	0,2482	0,415	0,575	0,186	0,389	5,2			
	0,2482	0,415	0,531	0,186	0,345	-0,1			
D	0,2625	0,258	0,923	0,406	0,517	34,5	46,2	10,8	23,3
	0,2625	0,258	1,109	0,406	0,703	55,8			
	0,2625	0,258	1,044	0,406	0,638	48,3			
E	0,4145	0,478	0,409	0,049	0,360	-2,8	0,9	3,2	365,2
	0,4145	0,478	0,489	0,049	0,440	3,0			

	0,4145	0,478	0,480	0,049	0,431	2,4			
	0,3415	0,570	0,489	0,141	0,348	-11,2			
F	0,3415	0,570	0,551	0,141	0,410	-5,7	-8,6	2,7	-31,9
	0,3415	0,570	0,516	0,141	0,375	-8,8			
	0,3609	0,516	0,443	0,137	0,306	-10,3			
G	0,3609	0,516	0,508	0,137	0,371	-4,9	-7,1	2,8	-39,7
	0,3609	0,516	0,493	0,137	0,356	-6,2			
	0,3699	0,532	0,406	0,061	0,345	-8,0			
H	0,3699	0,532	0,415	0,061	0,354	-7,2	-7,3	0,7	-9,5
	0,3699	0,532	0,423	0,061	0,362	-6,6			
	0,3623	0,611	0,667	0,103	0,564	4,5			
J	0,3623	0,611	0,776	0,103	0,673	13,6	8,9	4,5	50,8
	0,3623	0,611	0,716	0,103	0,613	8,6			
	0,3602	0,483	0,487	0,089	0,398	-0,4			
K	0,3602	0,483	0,550	0,089	0,461	4,9	1,4	3,0	208,6
	0,3602	0,483	0,489	0,089	0,400	-0,2			
	0,3156	0,508	0,363	0,044	0,319	-9,9			
L	0,3156	0,508	0,369	0,044	0,325	-9,3	-9,3	0,6	-6,6
	0,3156	0,508	0,376	0,044	0,332	-8,7			
	0,4037	0,304	0,461	0,092	0,369	8,6			
M	0,4037	0,304	0,464	0,092	0,372	8,8	8,1	1,1	13,0
	0,4037	0,304	0,438	0,092	0,346	6,9			
	0,4086	0,526	0,444	0,103	0,341	-7,1			
N	0,4086	0,526	0,395	0,103	0,292	-10,7	-7,2	3,5	-48,3
	0,4086	0,526	0,490	0,103	0,387	-3,8			
	0,4166	0,577	0,672	0,092	0,580	7,1			
O	0,4166	0,577	0,695	0,092	0,603	8,8	8,8	1,7	18,8
	0,4166	0,577	0,718	0,092	0,626	10,5			
	0,4244	0,361	0,350	0,020	0,330	2,1			
P	0,4244	0,361	0,394	0,020	0,374	5,2	2,7	2,2	80,7
	0,4244	0,361	0,334	0,020	0,314	0,9			
	0,4077	0,284	0,219	-0,012	0,231	-0,4			
Q	0,4077	0,284	0,248	-0,012	0,260	1,7	1,9	2,4	127,2
	0,4077	0,284	0,285	-0,012	0,297	4,4			
	0,4116	0,446	0,405	0,039	0,366	-0,4			
R	0,4116	0,446	0,470	0,039	0,431	4,3	3,0	3,0	99,3
	0,4116	0,446	0,480	0,039	0,441	5,1			
	0,4170	0,528	0,459	0,051	0,408	-2,3			
S	0,4170	0,528	0,472	0,051	0,421	-1,4	-0,2	2,9	-1503,0
	0,4170	0,528	0,534	0,051	0,483	3,1			

5 Diferenças entre as metodologias

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de concentração de alquenais, em base lipídica, obtidos pelo *kit* AlkalSafe™ STD, e p-anisidina.

Amostra	Conc. alquenais (nmol/kg óleo)	p-anisidina	Relação alquenais / p-anisidina
A	175,2444	-3,7	-47,1
	157,3260	-1,4	-114,2
	151,3532	-4,6	-33,1
	185,4226	2,8	66,8
B	177,4621	7,7	23,0
	209,2363	6,4	32,5
	100,5425	-3,7	-27,0
C	100,5425	5,2	19,3
	114,6652	-0,1	-1138,4
	119,7735	34,5	3,5
D	133,5812	55,8	2,4
	119,7735	48,3	2,5
	141,6781	-2,8	-51,1
E	149,8437	3,0	49,7
	166,1766	2,4	70,3
	227,1604	-11,2	-20,4
F	253,0325	-5,7	-44,3
	227,1604	-8,8	-25,9
	165,5316	-10,3	-16,1
G	165,5316	-4,9	-33,8
	189,9472	-6,2	-30,9
	162,1338	-8,0	-20,3
H	162,1338	-7,2	-22,4
	177,3272	-6,6	-26,9
	233,8250	4,5	51,5
J	233,8250	13,6	17,2
	233,8250	8,6	27,2
	341,1517	-0,4	-910,2
K	374,8865	4,9	76,9
	374,8865	-0,2	-1800,5
	285,2187	-9,9	-28,8
L	285,2187	-9,3	-30,5
	285,2187	-8,7	-32,9
	48,3150	25,7	1,9
O	59,5209	26,9	2,2
	70,7267	29,3	2,4

APÊNDICE J-5 – Resultados experimentais de concentração de malonaldeído e TBA das amostras de ração

1 Reagentes do *kit* AldeSafe™ STD

- calibradores: lote 4303003 / 4304003 / 4305003 / 4306003 / 4307003 (1 a 5, respectivamente) - validade: dez./2004;
- reagente A: lote 4313003 – validade: nov./2005;
- reagente B: lote 4309004 – validade: abr./2005;
- controles: 550015B - lote 0846002 / 550014B - lote 0845002 / 550013B - lote 0844002 (*low*, *medium* e *high*, respectivamente) – validade: 30/10/2004; e,
- reagente de preparação: 550001P / lote RD. Br – validade: 30/12/2004.

2 Amostras utilizadas

Mesmas amostras utilizadas para o *kit* AciSafe™ MSA.

3 Análises com o *kit* AldeSafe™ STD

3.1 Curva de calibração 1: amostras A, C, D e E

Equação: $y = 0,002 x - 0,002$; $r = 0,9999$

Tabela 1. Curva de calibração 1 para o *kit* AldeSafe™ STD, amostras A, C, D e E.

Conc. (nmol/kg)	Absorbância	Diferença (%)
0	-0,003	100,0
5	0,011	5,8
10	0,021	-2,4
25	0,058	1,4
50	0,116	-0,3

3.1.1 Teste dos controles

Tabela 2. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 1.

Controles	Absorbância	Conc. (nmol/kg)	Conc. Média (nmol/kg)	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,020	9,2043	9,2043	0,0	8,5-10,5
	0,020	9,2043			
	0,020	9,2043			
<i>medium</i>	0,039	17,276	17,184	2,5	17,5-19,5
	0,040	17,555			
	0,038	16,720			
	0,080	34,534			
<i>high</i>	0,077	33,142	33,884	2,1	33,0-37,0
	0,079	33,977			
	0,079	33,977			

3.2 Curva de calibração 2: amostras B, F, G, H, J a S

Equação: $y = 0,003 x - 0,006$; $r = 0,9999$

Tabela 3. Curva de calibração 2 para o *kit* AldeSafe™ STD, amostras B, F, G, H, J a S.

Conc. (nmol/kg)	Absorbância	Diferença (%)
0	-0,007	100,0
5	0,007	3,4
10	0,018	-3,7
25	0,058	1,6
50	0,119	-0,3

3.2.1 Teste dos controles

Tabela 4. Teste dos controles STD para a Curva de calibração 2.

Controles	Absorbância	Conc. (nmol/kg)	Conc. Média (nmol/kg)	CV (%)	Referência
<i>low</i>	0,017	9,1182	9,1182	2,9	8,5-10,5
	0,016	8,8554			
	0,017	9,3810			
<i>medium</i>	0,042	19,104	18,228	4,2	17,5-19,5
	0,038	17,790			
	0,038	17,790			
	0,079	33,819			
<i>high</i>	0,079	34,082	33,907	0,4	33,0-37,0
	0,079	33,819			
	0,079	33,819			

3.3 Amostras: em relação à massa de ração

Tabela 5. Resultados experimentais com o *kit* AldeSafe™ STD.

Amostra	Conc. (nmol/kg)	Diluição	Conc. Final (nmol/kg)	Conc. Média (nmol/kg)	DP	CV (%)
A	1,4106	2,5	3,5265	3,7584	0,4017	10,7
	1,4106	2,5	3,5265			
	1,6889	2,5	4,2223			
B	0,4466	2,5	1,1165	1,1165	0,0000	0,0
	0,4466	2,5	1,1165			
	0,4466	2,5	1,1165			
C	3,6374	2,5	9,0935	8,8615	0,4018	4,5
	3,6374	2,5	9,0935			
	3,3590	2,5	8,3975			
D	3,0807	2,5	7,7018	7,9337	0,4017	5,1
	3,0807	2,5	7,7018			
	3,3590	2,5	8,3975			
E	3,3590	2,5	8,3975	8,1656	0,4017	4,9
	3,0807	2,5	7,7018			
	3,3590	2,5	8,3975			
F	2,2860	2,5	5,7150	6,3719	0,6569	10,3
	2,5488	2,5	6,3720			
	2,8115	2,5	7,0288			
G*	-1,9184	2,5	-4,7960	-3,0442	2,0069	-65,9
	-1,3928	2,5	-3,4820			
	-0,3418	2,5	-0,8545			
H*	-2,7068	2,5	-6,7670	-3,9201	2,4873	-63,4
	-1,1300	2,5	-2,8250			
	-0,8673	2,5	-2,1683			
J*	-1,6556	2,5	-4,1390	-3,7010	0,7586	-20,5
	-1,1300	2,5	-2,8250			
	-1,6556	2,5	-4,1390			
K*	-0,0791	2,5	-0,1978	-3,0443	2,4869	-81,7
	-1,6556	2,5	-4,1390			
	-1,9184	2,5	-4,7960			
L**	0,4466	2,5	1,1165	0,0215	1,0036	4667,8
	-0,0790	2,5	-0,1975			
	-0,3418	2,5	-0,8545			
M	5,7020	2,5	14,2550	13,1601	1,0036	7,6
	4,9136	2,5	12,2840			
	5,1765	2,5	12,9413			

N*	-4,2834	2,5	-10,7085			
	-4,2834	2,5	-10,7085	-10,7085	0,0000	0,0
	-4,2834	2,5	-10,7085			
O	4,9136	2,5	12,2840			
	4,6509	2,5	11,6273	12,5031	1,0035	8,0
	5,4392	2,5	13,5980			
P	1,7604	2,5	4,4010			
	2,0233	2,5	5,0583	4,8392	0,3795	7,8
	2,0233	2,5	5,0583			
Q	4,6509	2,5	11,6273			
	5,1765	2,5	12,9413	12,0653	0,7586	6,3
	4,6509	2,5	11,6273			
R	3,0743	2,5	7,6858			
	2,8115	2,5	7,0288	7,0288	0,6569	9,3
	2,5488	2,5	6,3720			
S	7,5416	2,5	18,8540			
	8,8554	2,5	22,1385	20,1678	1,7380	8,6
	7,8043	2,5	19,5108			

*valores abaixo do limite de detecção da curva de calibração (0 a 55 nmol/kg).

**apesar de CV elevado, os valores de absorbância eram muito baixos, respectivamente -0,005; -0,007 e -0,007 e pouco diferiram entre si. O problema foi que a curva de calibração passou pela origem justamente em - 0,006A.

3.4 Amostras: em relação ao teor de óleo da amostra

Tabela 6. Resultados experimentais com o *kit* AldeSafe™ STD, em base lipídica.

Amostra	Conc. (nmol/kg ração)	% óleo	Conc. (nmol/kg óleo)
A	3,5265	19,7	17,9260
	3,5265	19,7	17,9260
	4,2223	19,7	21,4627
B	1,1165	14,8	7,5481
	1,1165	14,8	7,5481
	1,1165	14,8	7,5481
C	9,0935	24,9	36,4583
	9,0935	24,9	36,4583
	8,3975	24,9	33,6679
D	7,7018	17,0	45,2672
	7,7018	17,0	45,2672
	8,3975	17,0	49,3564
E	8,3975	14,4	58,3829
	7,7018	14,4	53,5458
	8,3975	14,4	58,3829

F	5,7150	13,6	41,9458
	6,3720	13,6	46,7679
	7,0288	13,6	51,5882
	14,2550	14,4	98,7220
M	12,2840	14,4	85,0720
	12,9413	14,4	89,6237
	12,2840	15,5	79,4198
O	11,6273	15,5	75,1738
	13,5980	15,5	87,9153
	4,4010	16,8	26,2701
P	5,0583	16,8	30,1933
	5,0583	16,8	30,1933
	11,6273	10,4	111,2745
Q	12,9413	10,4	123,8496
	11,6273	10,4	111,2745
	7,6858	11,7	65,8294
R	7,0288	11,7	60,2021
	6,3720	11,7	54,5770
	18,8540	12,3	153,1611
S	22,1385	12,3	179,8429
	19,5108	12,3	158,4962

4 TBA, segundo AOCS

Tabela 7. Resultados experimentais de TBA.

Amostra	Massa (g)	Abs (A)	Branco (A)	n° TBA	n° TBA Médio	DP	CV (%)
A	0,1593	0,442	0,123	0,040	0,040	0,001	1,6
	0,1534	0,434	0,123	0,041			
	0,1511	0,420	0,123	0,039			
B	0,1679	0,684	0,123	0,067	0,065	0,002	3,0
	0,1551	0,611	0,123	0,063			
	0,1749	0,693	0,123	0,065			
C	0,2059	0,459	0,088	0,036	0,040	0,004	10,9
	0,2029	0,540	0,088	0,045			
	0,2412	0,556	0,088	0,039			
D	0,2133	0,704	0,088	0,058	0,058	0,004	7,2
	0,2173	0,759	0,088	0,062			
E	0,2557	0,772	0,088	0,054	0,072	0,004	5,7
	0,2018	0,792	0,088	0,070			
	0,2086	0,885	0,088	0,076			

	0,2040	0,792	0,088	0,069			
	0,1662	0,599	0,123	0,057			
F	0,1695	0,576	0,123	0,053	0,056	0,002	3,9
	0,1574	0,573	0,123	0,057			
	0,2153	0,695	0,088	0,056			
G	0,2433	0,723	0,088	0,052	0,056	0,004	6,3
	0,2091	0,707	0,088	0,059			
	0,1524	0,348	0,123	0,030			
H	0,1673	0,389	0,123	0,032	0,034	0,006	18,0
	0,1512	0,434	0,123	0,041			
	0,1745	0,428	0,123	0,035			
J	0,1536	0,345	0,123	0,029	0,032	0,003	9,7
	0,1666	0,381	0,123	0,031			
	0,1526	0,231	0,089	0,019			
K	0,1517	0,299	0,089	0,028	0,022	0,005	21,6
	0,1556	0,248	0,089	0,020			
	0,2576	0,210	0,096	0,009			
L	0,2450	0,219	0,096	0,010	0,009	0,001	6,3
	0,2529	0,215	0,096	0,009			
	0,1502	0,385	0,089	0,039			
M	0,1662	0,412	0,089	0,039	0,040	0,001	3,3
	0,1567	0,413	0,089	0,041			
	0,1624	0,474	0,089	0,047			
N	0,1635	0,414	0,089	0,040	0,041	0,006	15,2
	0,1690	0,386	0,089	0,035			
	0,1640	0,445	0,089	0,043			
O	0,1715	0,489	0,089	0,047	0,046	0,002	4,1
	0,1608	0,464	0,089	0,047			
	0,1737	0,380	0,096	0,033			
P	0,2000	0,411	0,096	0,032	0,032	0,001	2,5
	0,1896	0,409	0,096	0,033			
	0,1938	0,436	0,096	0,035			
Q	0,1818	0,445	0,096	0,038	0,036	0,002	6,8
	0,1807	0,400	0,096	0,034			
	0,1679	0,409	0,096	0,037			
R	0,1715	0,432	0,096	0,039	0,038	0,001	2,5
	0,1717	0,427	0,096	0,039			
	0,1783	0,442	0,096	0,039			
S	0,1732	0,450	0,096	0,041	0,040	0,001	2,6
	0,1877	0,468	0,096	0,040			

5 Diferenças entre as metodologias

Tabela 8. Tabela comparativa dos resultados experimentais de concentração de malonaldeído, em base lipídica, obtidos pelo *kit* AdeSafe™ STD, e número de TBA.

Amostra	Conc. MDA (nmol/kg óleo)	nº TBA	Relação MDA/TBA
A	17,9260	0,040	447,6
	17,9260	0,041	442,1
	21,4627	0,039	546,0
B	7,5481	0,067	113,0
	7,5481	0,063	119,9
	7,5481	0,065	115,8
C	36,4583	0,036	1011,7
	36,4583	0,045	818,3
	33,6679	0,039	867,6
D	45,2672	0,058	783,7
	45,2672	0,062	733,0
	49,3564	0,054	922,5
E	58,3829	0,070	836,8
	53,5458	0,076	700,7
	58,3829	0,069	845,9
F	41,9458	0,057	732,3
	46,7679	0,053	875,0
	51,5882	0,057	902,2
M	98,7220	0,039	2504,7
	85,0720	0,039	2188,7
	89,6237	0,041	2167,3
O	79,4198	0,043	1829,3
	75,1738	0,047	1611,5
	87,9153	0,047	1884,9
P	26,2701	0,033	803,4
	30,1933	0,032	958,5
	30,1933	0,033	914,5
Q	111,2745	0,035	3171,3
	123,8496	0,038	3225,8
	111,2745	0,034	3307,1
R	65,8294	0,037	1765,6
	60,2021	0,039	1536,4
	54,5770	0,039	1415,5
S	153,1611	0,039	3946,3
	179,8429	0,041	4399,5
	158,4962	0,040	3998,6

APÊNDICE K - Resultados experimentais da comparação de médias, através de ANOVA, para %AGL de rações (*kit* AciSafe™ MSA)

a) Sem o emprego de fatores de correção

Comparando os valores de %AGL obtidos pelo *kit* AciSafe™ MSA com os resultados dados pelo método oficial modificado, através de ANOVA, obteve-se a os dados da Tabela 1.

Tabela 1. ANOVA para comparação de médias - *kit* AciSafe™ MSA.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	87,27	1	87,27	15,86	≅ 6,90 (α= 1%)	0,0001
Amostras	3296,21	17	193,89		≅ 3,95 (α= 5%)	
Resíduo	489,54	89	5,50			
Total	3873,02	107				

$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}} (1\%) \Rightarrow$ existe diferença significativa entre metodologias

$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}} (5\%) \Rightarrow$ existe diferença significativa entre metodologias

b) Aplicando o fator de correção 1,20 para os valores obtidos pelo *kit*

Tabela 2. ANOVA para comparação de médias, aplicando o fator de correção de 1,20 para as determinações com o *kit* AciSafe™ MSA.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	0,41	1	0,41	0,09	≅ 6,90 (α= 1%)	0,7647
Amostras	3769,57	17	221,74		≅ 3,95 (α= 5%)	
Resíduo	403,80	89	4,54			
Total	4173,78	107				

$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}} (1\%) \Rightarrow$ não existe diferença significativa entre metodologias

$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}} (5\%) \Rightarrow$ não existe diferença significativa entre metodologias

c) Aplicando o fator de correção 1,30 para os valores obtidos pelo *kit*:

Tabela 3. ANOVA para comparação de médias, aplicando o fator de correção de 1,30 para as determinações com o *kit* AciSafe™ MSA.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	13,77	1	13,77	3,28	$\cong 6,90 (\alpha= 1\%)$	0,0737
Amostras	4019,31	17	236,43		$\cong 3,95 (\alpha= 5\%)$	
Resíduo	374,3	89	4,21			
Total	4407,38	107				

$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}} (1\%) \Rightarrow$ não existe diferença significativa entre metodologias

$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}} (5\%) \Rightarrow$ não existe diferença significativa entre metodologias

d) Aplicando o fator de correção 1,40 para os valores obtidos pelo *kit*:

Tabela 4. ANOVA para comparação de médias, aplicando o fator de correção de 1,40 para as determinações com o *kit* AciSafe™ MSA.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	65,00	1	65,00	16,36	$\cong 6,90 (\alpha= 1\%)$	0,0001
Amostras	4277,75	17	251,63		$\cong 3,95 (\alpha= 5\%)$	
Resíduo	353,71	89	3,97			
Total	4696,46	107				

$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}} (1\%) \Rightarrow$ existe diferença significativa entre metodologias

$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}} (5\%) \Rightarrow$ existe diferença significativa entre metodologias

e) Aplicando o fator de correção 1,10 para os valores obtidos pelo *kit*:

Tabela 5. ANOVA para comparação de médias, aplicando o fator de correção de 1,10 para as determinações com o *kit* AciSafe™ MSA.

Fonte de Variação	SQ	GL	SQM	F _{Calc}	F _{Tab metod.}	Pr > F
Metodologias	24,85	1	24,85	5,00	≅ 6,90 (α= 1%)	0,0279
Amostras	3523,98	17	207,29		≅ 3,95 (α= 5%)	
Resíduo	442,63	89	4,97			
Total	3991,46	107				

$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}} (1\%) \Rightarrow$ não existe diferença significativa entre metodologias

$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}} (5\%) \Rightarrow$ existe diferença significativa entre metodologias

