



**Cláudia Raquel
Barroso da Silva
Gaspar**

**Desenvolvimento de um sensor de massa para
seguir a degradação da manteiga**



**Cláudia Raquel Barroso Desenvolvimento de um sensor de massa para
da Silva Gaspar seguir a degradação da manteiga**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Instrumentais e Controlo de Qualidade Analítica, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Dr. Armando da Costa Duarte
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Alberto António Caria Canelas Pais
Professor Associado da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Prof. Dr. Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes
Professora Associada da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À minha supervisora, Prof. Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, por ter proporcionado a realização deste trabalho e por todo o interesse, disponibilidade e amizade demonstradas.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda, simpatia e camaradagem ao longo destes dois anos.

À Prof. Doutora Sílvia Rocha por ter disponibilizado o GC-MS durante a parte experimental.

Aos meus pais e irmão, a quem eu dedico este trabalho, pelo incansável apoio, incentivo e confiança ao longo de todos estes anos.

Aos meus queridos avós, que embora ausentes, estiveram sempre ao meu lado, nos bons e nos maus momentos.

E a todos os meus queridos amigos e familiares que sempre me apoiaram.

palavras-chave

Sensor de ondas acústicas, microbalança de cristais piezoelétricos, degradação da manteiga.

resumo

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver um sensor de massa para seguir a degradação da manteiga. Foi utilizado um cristal piezoelétrico de 9 MHz revestido.

O sensor apenas detecta variações de massa, que se devem a qualquer composto volátil que interaja com o revestimento de cristal. A vantagem prática em traduzir por um único número o “ranço” da manteiga, tem o inconveniente de não permitir identificar os compostos responsáveis pelo sinal analítico. Para ajudar na compreensão do mecanismo e identificar os compostos responsáveis pelo funcionamento do sensor, e mostrar até que ponto é que se pode dizer que o mesmo é capaz de “seguir a degradação da manteiga” recorreu-se à Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa.

keywords

Acoustic wave sensor, quartz crystal microbalance, butter degradation.

abstract

The main objective of this work was to develop a sensor to follow butter degradation. The sensor used a coated 9 MHz piezoelectric crystal. The sensor can only detect mass changes, which arise from the interaction between volatile substances and the crystal coating. The output of the sensor is a single numeric parameter, which renders rancidity degree to be easily perceived. However, it is not possible to have an insight into the rancidity process, and it is impossible to identify the volatile compounds evolved during butter degradation. In order to help in the understanding of rancidity mechanism, to identify the volatile compounds and to evaluate the sensor performance, analyses by GC/MS have also been performed.

Índice

<u>1. Introdução.....</u>	<u>9</u>
<u>2. Constituição da manteiga.....</u>	<u>10</u>
2.1. O que é a manteiga.....	10
2.2. Constituição da manteiga.....	12
<u>3. Degradação da manteiga.....</u>	<u>15</u>
3.1 Rancidez oxidativa ou auto-oxidação: Formação de hidroperóxidos.....	17
3.1.1 Mecanismo de radical livre.....	17
3.1.2 Mecanismo de foto-oxidação.....	19
3.1.3 Mecanismo da lipoxigenase.....	19
3.1.4 Produtos de reacção secundária.....	20
3.2 Rancidez hidrolítica.....	23
3.3 Antioxidantes.....	24
3.4 Efeitos da degradação da manteiga na apreciação por parte do consumidor.....	25
3.5 Efeitos da degradação da manteiga na Saúde.....	27
<u>4. Métodos para quantificar a degradação da manteiga.....</u>	<u>29</u>
4.1 Método sensorial.....	29
4.2 Método químico.....	30
4.2.1 Testes de previsão da resistência à rancidez.....	30
4.2.2 Testes indicadores da rancidez.....	33
4.2.2.1 Medição da rancidez oxidativa.....	33
4.2.2.2 Medição da rancidez cetónica.....	38
4.2.2.3 Medição da rancidez hidrolítica.....	38
<u>5. Sensor de massa para seguir a degradação da manteiga.....</u>	<u>40</u>
5.1. Cristais piezoeléctricos.....	40
5.2. Critérios para a escolha do revestimento.....	46
5.3. Revestimento.....	47
5.3.1. Preparação do filme de decanoditiol.....	47
5.3.1.1 Limpeza do cristal de ouro.....	47
5.3.1.2 Revestimento do cristal.....	49
<u>6. Cromatografia gasosa com espectrómetro de massa.....</u>	<u>51</u>
6.1. Separação Cromatográfica.....	51

6.2 O Espectrómetro de Massa.....	54
6.2.1. Fonte de Ionização.....	55
6.2.2. Analisador Quadrupolar.....	57
6.2.3. Aquisição e Tratamento de Dados.....	58
7. Micro-extracção em fase sólida (SPME).....	59
7.1 Fibras utilizadas.....	59
7.2 Técnica de Micro-extracção em fase sólida.....	60
7.2.1. Introdução.....	60
7.2.2. Extracção no espaço de cabeça.....	64
8. Parte experimental.....	65
8.1 Reagentes.....	65
8.2 Fibra utilizada.....	65
8.3 Montagem e Procedimento Experimental para adsorção dos compostos de espaço de cabeça. por SPME.....	66
8.4 Cromatografia gasosa - espectrometria de massa.....	68
8.4.1. Instrumento.....	68
8.4.2. Metodologia Experimental.....	68
8.5 Sensor de Massa.....	70
8.5.1 Instrumentação.....	70
8.5.2 Metodologia Experimental.....	71
8.5.3. Revestimento dos cristais piezoeléctricos.....	72
8.5.3.1. Preparação do filme de decanoditiol.....	72
8.5.3.1.1 Limpeza do cristal de ouro.....	72
8.5.3.1.2 Revestimento do cristal.....	73
8.6 Avaliação sensorial.....	74
9. Resultados Experimentais e Discussão.....	75
9.1. Análise por cromatografia gasosa - espectrometria de massa.....	75
9.1.1. Reprodutibilidade da análise por GC/MS.....	88
9.1.2. Sensibilidade do sistema fibra/GC/MS.....	92
9.2. Respostas do sensor em contacto com os compostos voláteis da manteiga.....	94
9.2.1. Reprodutibilidade do sistema fibra/sensor.....	98
9.2.2. Sensibilidade do sistema fibra/sensor.....	99

9.3. <i>Análise sensorial</i>	101
9.4 <i>Discussão dos Resultados</i>	104
<u>10. Conclusão</u>	112
<u>11. Referências bibliográficas</u>	113

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Diferenças na composição da manteiga com sal e sem sal.....</i>	<i>12</i>
<i>Tabela 2 - Exemplos de ácidos gordos saturados mais frequentes.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabela 3 - Exemplos de ácidos gordos insaturados mais frequentes.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabela 4 - Cheiros característicos dos produtos resultantes da degradação da manteiga.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 5 - Medianas e amplitude das áreas dos picos dos compostos dos cromatogramas da manteiga.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabela 6 - Registo da sensibilidade do sistema fibra/GC/MS para cada composto.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabela 7 - Respostas do sensor para as cinco amostras de manteiga.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabela 8 - Respostas do sistema fibra/sensor a diferentes compostos.....</i>	<i>99</i>
<i>Tabela 9 - Avaliação sensorial da manteiga realizada por seis pessoas ao longo de um período de 46 dias.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabela 10 - Comparação da sensibilidade dos principais compostos presentes na manteiga, no sistema fibra/sensor e no sistema fibra/GC/MS.....</i>	<i>104</i>

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - . Fases da preparação da manteiga.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2 - Ligação de um ácido gordo a um glicérol.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 3 - Degradação de um lípido por acção de enzimas lipídicas.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4 - Representação dos ácidos gordos oleico, linoleico e linolénico.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 5 - Auto-oxidação do oleato de metilo.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 6 - Produtos secundários da rancidez oxidativa.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 7 - Peroxidação do ácido oleico, originando um aldeído (hexanal).....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 8 - Formação de um álcool e de um hidrocarboneto a partir de um radical alcoxi livre.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 9 - Formação de álcool e de um hidrocarboneto a partir de um radical alcoxi livre.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 10 - Reacção hidrolítica.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 11 - Degradação de um lípido, numa reacção hidrolítica, originando lactonas.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 12- Estrutura cristalina do quartzo com representação dos eixos coordenados.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 13 - Orientação do corte AT.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 14 - Movimento no modo de cisalhamento, com a dupla seta a indicar o deslocamento das partículas superficiais do cristal.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 15 - Imagens AFM do cristal Au/Si (a) limpo com o solvente e (b) limpo por uma breve imersão na solução piranha seguida de ciclo electroquímico entre os 0 e -0.8 V.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 16 - Resposta de voltametria cíclica de 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ em 1 M de NaCl das camadas auto-montadas de hexadecanotiol no cristal de Au/Si depois de (a) enxaguado com solvente, (b)</i>	

<i>breve imersão em H_2O_2/H_2SO_4 quente 1:3 e (c) tratamento com solução piranha seguida de voltametria cíclica entre os 0 e -0.8 V.....</i>	49
Figura 17 - <i>Esquema ilustrativo do procedimento utilizado na preparação das monocamadas auto-montadas.....</i>	50
Figura 18 - <i>Esquema ilustrativo de um tio-composto numa monocamada auto-montada.....</i>	50
Figura 19 - <i>Esquema ilustrativo de um cromatógrafo a gás.....</i>	52
Figura 20 - <i>Esquema ilustrativo de um Espectrómetro de Massa.....</i>	55
Figura 21 - <i>Esquema ilustrativo da fonte de ionização de um espectrómetro de massa.....</i>	56
Figura 22 - <i>Esquema ilustrativo de um analisador quadrupolar.....</i>	57
Figura 23 - <i>Método de extracção no espaço de cabeça.....</i>	64
Figura 24 - <i>Frasco de manteiga inserido no banho-maria.....</i>	67
Figura 25 - <i>Método de espaço de cabeça para a amostra de manteiga, à temperatura de 45°C.....</i>	67
Figura 26 - <i>Cromatógrafo de gás/espectrómetro de massa.....</i>	68
Figura 27 - <i>Introdução da fibra no GC/MS.....</i>	69
Figura 28 - <i>Programa de temperaturas utilizado no GC/MS.....</i>	69
Figura 29 - <i>Dispositivo experimental para o sensor de massa.....</i>	71
Figura 30 - <i>Cristal piezoelétrico mergulhado na solução piranha, utilizando uma pinça.....</i>	72
Figura 31 - <i>Voltamograma cíclico.....</i>	73
Figura 32 - <i>Cromatograma de uma manteiga às zero horas.....</i>	75
Figura 33 - <i>Cromatograma de uma manteiga às noventa e seis horas (4 dias).....</i>	76
Figura 34 - <i>Cromatograma de uma manteiga às duzentas e catorze horas (9 dias).....</i>	76

<i>Figura 35 - Cromatograma de uma manteiga às trezentas e vinte e sete horas (13,6 dias).....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 36 - Cromatograma de uma manteiga às quatrocentos e quarenta e cinco horas (18,5 dias).....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 37 - Cromatograma de uma manteiga às quinhentas e cinquenta horas (22,9 dias).....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 38 - Cromatograma de uma manteiga às seiscentas e quarenta e uma horas (26,7 dias).....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 39 - Cromatograma de uma manteiga às setecentas e quarenta e oito horas (31,2 dias).....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 40 - Cromatograma de uma manteiga às oitocentas e sessenta e quatro horas (36 dias).....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 41 - Cromatograma de uma manteiga às mil horas (41,6 dias).....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 42 - Cromatograma de uma manteiga às mil e cem horas (45,8 dias).....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 43 - Espectro de massa da 2-propanona.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 44 - . Espectro de massa da 2-butanona.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 45- . Espectro de massa do 2-pentanona.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 46 - . Espectro de massa da 2-heptanona.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 47 - . Espectro de massa da 3-hidroxi-2-butanona.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 48 - . Espectro de massa do 1-hexanol.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 49 - . Espectro de massa da 2-nonanona.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 50 - . Espectro de massa do ácido acético.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 51 - . Espectro de massa do ácido propanóico.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 52 - . Espectro de massa da 2-undecanona.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 53 - . Espectro de massa do ácido butanóico.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 54 - . Espectro de massa do ácido pentanóico.....</i>	<i>86</i>

<i>Figura 55 - Espectro de massa do ácido hexanóico.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 56 - Gráfico das medianas das áreas dos picos cromatográficos dos diversos compostos em função do tempo.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 57 - Gráfico das medianas das áreas dos picos cromatográficos dos diversos compostos em função do tempo, numa escala mais ampliada.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 58 - Gráfico das rectas de calibração dos diversos compostos obtidos com o sistema fibra/GC/MS.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 59 - Curva da resposta do sensor à manteiga.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 60 - Curva da resposta do sensor à 2-pentanona.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 61 - Curva da resposta do sensor à 2-heptanona.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 62 - Curva da resposta do sensor à 2-nonanona.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 63 - Representação gráfica do decréscimo da frequência ao longo do tempo.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 64 - Representação gráfica das rectas de calibração obtidas com o sistema fibra/sensor.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 65 - Respostas obtidas com o sensor e alguns cromatogramas em diferentes fases do processo da degradação da manteiga.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 66 - Resultados sobrepostos das respostas do sensor com a soma das medianas das áreas dos picos cromatográficos bem como os pontos de alteração do cheiro.....</i>	<i>107</i>

1. Introdução

Neste trabalho pretende-se desenvolver um sensor para seguir a degradação da manteiga. Pretende-se que o sensor seja capaz de detectar a degradação da manteiga ao longo do tempo através do registo da variação da frequência do cristal piezoelétrico.

O sensor apenas detecta variações de massa, que se devem a qualquer composto volátil que interaja com o revestimento de cristal. Não é possível por isso identificar os compostos responsáveis pelo sinal analítico. Para ajudar na compreensão do mecanismo e identificar compostos responsáveis pelo funcionamento do sensor, e mostrar até que ponto é que se pode dizer que o mesmo é capaz de “seguir a degradação da manteiga” utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa (GC/MS) e recorreu-se a padrões, de forma a identificar os compostos da manteiga que se desprendem ao longo do tempo.

A comparação dos resultados dos dois métodos na análise de padrões permitem comparar a sensibilidade do sistema fibra/GC/MS e fibra/sensor na detecção dos compostos resultantes da degradação da manteiga

Este sensor terá especial importância no controlo da qualidade de produto e mesmo na área da saúde.

2. Constituição da manteiga

2.1 O que é a manteiga

A manteiga não é uma invenção recente, tem já cerca de 3000 anos, sendo o primeiro registo que se conhece deste produto datado de 1750 a.C.

Ao longo de todos estes anos o seu fabrico sofreu grandes transformações, deixando de ser um processo artesanal. Esta evolução, longe de diminuir as qualidades da manteiga, antes contribuiu para a sua melhoria, nomeadamente através da introdução de normas de higiene. O diagrama, representado na figura 1, ilustra as fases de preparação da manteiga.

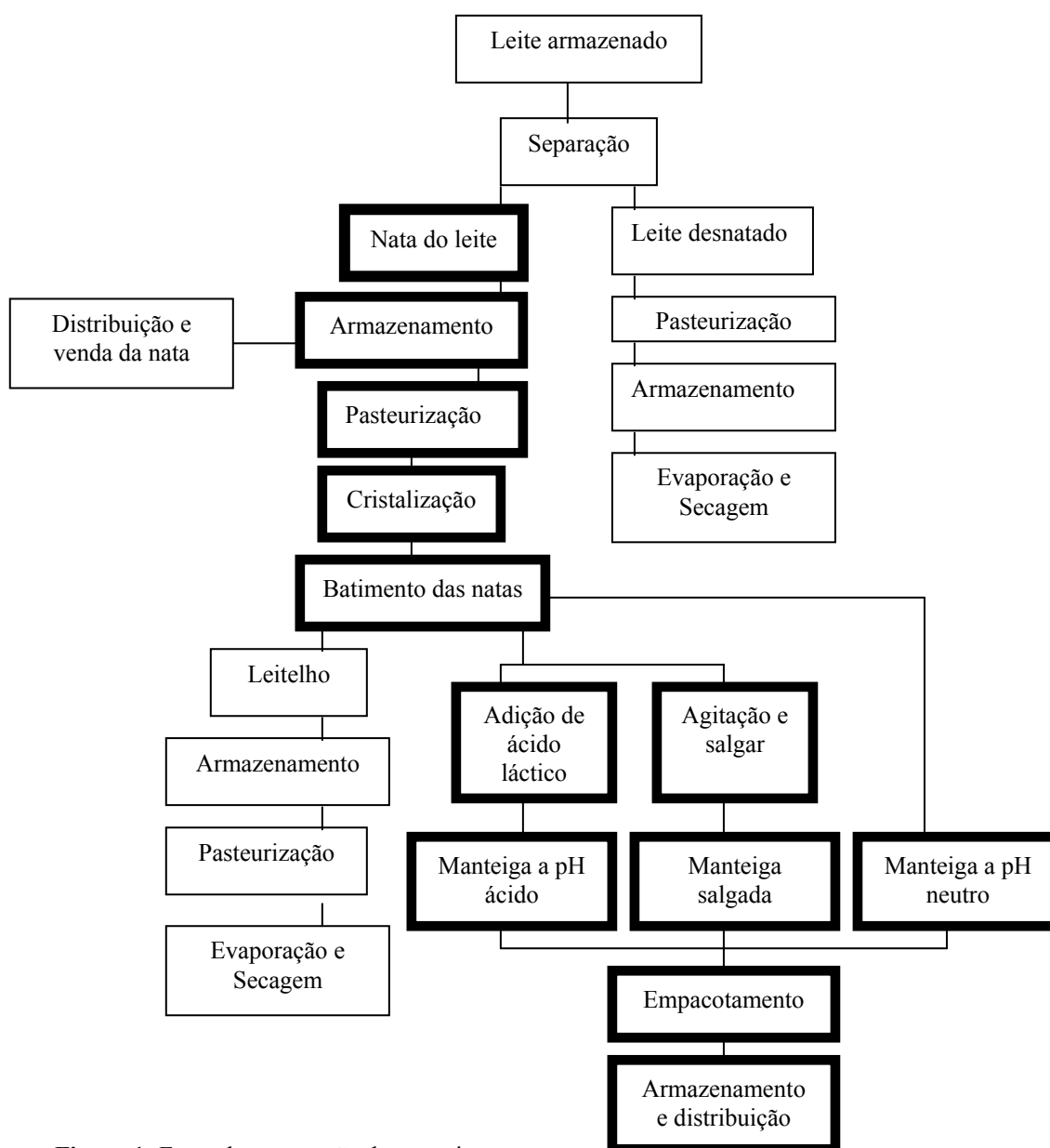


Figura 1- Fases da preparação da manteiga.

A desnatação do leite consiste na separação da matéria gorda do leite, aproveitada para a elaboração da nata (utilizando centrífugas). A nata resultante pode ser aproveitada para venda, ou então para a preparação da manteiga [1,2,3].

Tal como o leite, a nata é objecto de um tratamento, cuja finalidade é eliminar todas as bactérias que ela possa conter. A pasteurização é um processo térmico, que consiste em submeter a nata a uma temperatura elevada, durante alguns segundos, para logo a seguir a arrefecer muito rapidamente [1,2,3].

Após a pasteurização, adicionam-se fermentos lácteos à nata, com o objectivo de facilitar a batimento da mesma para além de acidificar o produto e lhe dar um sabor agradável. Deixa-se amadurecer o produto, num programa de arrefecimento de forma a se obter a gordura com uma dada estrutura cristalina [1,2,3]. Este processo demora cerca de 12-15 horas.

Como já foi referido, para se transformar em manteiga, a nata precisa de ser batida. Esta agitação enérgica e repetitiva faz com a matéria gorda se una, libertando um líquido resultante do leite inicial, o leitelho (líquido que sobra após a manteiga ter sido separada do leite). O tempo de batimento, varia de acordo com a temperatura de amanteigamento, regulada no Verão entre 8 e 10 graus Celsius e, no Inverno entre os 10 e 13 graus Celsius [1].

Nessa altura a manteiga é submetida a uma lavagem com água pura de forma a libertar a manteiga, propriamente dita, e remover algum leitelho ou resíduos sólidos do leite (o que hoje em dia pouco se faz).

A partir deste momento, podem-se obter três tipos de manteiga: manteiga ácida (com pH até 5), manteiga neutra (com pH igual a 7) ou simplesmente manteiga com sal. A manteiga ácida é obtida quando durante o batimento se adiciona ácido láctico. A manteiga neutra é obtida sem adição de qualquer produto. A manteiga salgada resulta da adição de sal durante o batimento [2,3].

Uma última agitação vai encerrar o processo, repartindo uniformemente a água pela matéria gorda, para que o produto apresente uma humidade satisfatória (é conveniente deixar cerca de 16% de água).

A agitação deve ser vigorosa pois influencia as características pelas quais a manteiga é apreciada - aroma, sabor, aparência e cor. A agitação é requerida para obter uma mistura de grânulos de manteiga, sal e água. Durante a agitação, a gordura (os ácidos gordos) passa de globular para gordura livre (ácidos gordos livres) [2,3].

Posteriormente, para melhor conservação, mantém-se o produto em câmaras frigoríficas e a embalagem deve evitar a infiltração de luz [1].

A manteiga, geralmente, conserva-se por um ano, se a temperatura de armazenamento se situar entre os 0° e 4°C.

2.2 Constituição da manteiga

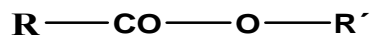
A composição da manteiga depende da constituição da gordura do leite utilizada bem como do seu processo de fabrico. Tendo isto em conta a tabela 1 mostra as diferenças na composição da manteiga com sal e sem sal.

Tabela 1 - Diferenças na composição da manteiga com sal e sem sal.

	Manteiga com Sal	Manteiga sem Sal
Gordura	$\geq 80\%$	82%
Acidez Total	5 cm ³ /100g de manteiga	5 cm ³ /100g de manteiga
Acidez Oleica	0,30g de ac./100g de manteiga	0,30g de ac./100g de manteiga
Sal	max. 2%	-----
Humidade	max. 16%	16%
Índice de peróxidos	0,3 meq de O ₂ /100g de manteiga	0,3 meq de O ₂ /100g de manteiga

No caso das manteigas salgadas a concentração de sal na fase aquosa é suficientemente elevada para impedir o crescimento de muitos organismos. Isto significa que a manteiga pode manter uma qualidade aceitável durante várias semanas a temperaturas moderadas, e ainda mais se for refrigerada ou congelada [2].

Os cerca de 80 % de gordura da manteiga são constituídos por triglicerídeos, que não são mais do que ácidos gordos ligados a três carbonos da molécula de glicerol [4], tal como ilustra a figura 2.



Lig. Éster

Lípido

Figura 2 - Ligação de um ácido gordo a um glicerol [5].

A gordura do leite contém uma grande variedade de ácidos gordos que têm a sua origem principalmente na alimentação, podem resultar ainda da mobilização das reservas dos tecidos que são metabolizadas para produzir energia quando a dieta é deficiente e ainda ser sintetizados na própria vaca [2,3].

Na sua maioria, os ácidos gordos são saturados uma vez que os processos de redução que ocorrem na pança do animal convertem os substratos insaturados na forma saturada. A síntese dos ácidos na vaca resulta essencialmente na produção de ácidos de cadeia curta de quatro a catorze átomos de carbono (C4-C14) e na produção de algum ácido palmítico (C16). Cerca de 30% da gordura do leite é insaturado, sendo esta gordura insaturada constituída principalmente por ácido oleico (C18:1). Este forma-se principalmente na glândula mamária, onde existe uma desnaturase C18:0 específica que converte o ácido esteárico (C18:0) em ácido oleico (C18:1) [2].

Os ácidos gordos mais comuns são ácidos carboxílicos de cadeia curta com um número par de carbonos, que vão desde a pequena cadeia saturada do ácido butanóico (C4:0) à longa cadeia saturada do ácido esteárico (C18:0) (ver tabela 2) [2,5,6,7]. Alguns dos ácidos podem conter uma ou mais ligações duplas (mono ou poliinsaturados). As ligações duplas apresentam sempre a configuração *cis* e dificilmente são conjugadas.

Raramente ocorrem ligações triplas. Na tabela 3 listam-se os ácidos insaturados mais vulgares [2,5,6,7].

O estado físico dos ácidos gordos depende do número de insaturação e quanto maior for o número de ligações duplas menor será o ponto fusão. Desta forma, estas gorduras apresentam-se em estado sólido, quando a temperatura ambiente for inferior a 25 °C [4].

Tabela 2- Exemplos de ácidos gordos saturados mais frequentes.

Nome comum	IUPAC	N.º de carbonos	Conteúdo médio em 100 g de manteiga [7]
Butírico	Butanóico	4	2,63 g
Capróico	Hexanóico	6	1,56 g
Caprílico	Octanóico	8	0,91 g
Cáprico	Decanóico	10	2,03 g
Laurico	Dodecanóico	12	2,28 g
Mirístico	Tetradecanóico	14	8,16 g
Palmítico	Hexadecanóico	16	21,33 g
Estearico	Octadecanóico	18	9,83 g

Tabela 3: Exemplos de ácidos gordos insaturados mais frequentes:

N.º de Δ	Nome comum	IUPAC	N.º de Carbonos	Conteúdo médio em 100 g de manteiga [7]
1	Palmitoleico	Hexadecanóico	16	1,82 g
1	Oleico	Octadecanóico	18	20,40 g
2	Linoleico	Octodecadienóico	18	1,83 g
3	Linolénico	Octodecatrienóico	18	1,18 g

(Δ – Ligação dupla)

3. Degradação da manteiga

Uma das alterações mais comuns da manteiga é o aparecimento do ranço. O ranço está associado ao cheiro e ao sabor desagradável que se desprende de alguns alimentos, geralmente produtos lácteos ou óleos e gorduras, quando impróprios para consumo. O mau cheiro também pode ter origem na absorção e/ou contaminação em presença de comidas rançosas [2,8]. Os lípidos são os grandes responsáveis por estas alterações.

A rancidez pode ser causada pelas alterações que ocorrem a partir da reacção com o oxigénio atmosférico – rancidez oxidativa – e também ser produzida por reacções hidrolíticas catalisadas por enzimas – rancidez hidrolítica [1,2,9,10,11,12].

As reacções hidrolíticas e os efeitos de absorção podem ser minimizados por: armazenamento em local fresco, boas condições de transporte, empacotamento cuidadoso e boas condições de higiene, enquanto que a rancidez oxidativa, ou auto-oxidação, não é minimizada pelo abaixamento da temperatura de armazenamento da comida [1,2,10,11]. Isto verifica-se porque a auto-oxidação é uma reacção química com baixa energia de activação, 4-5 kcalmol⁻¹, no primeiro passo e 6-14 kcalmol⁻¹ para o segundo passo [10].

Factores importantes para o controlo da auto-oxidação são a exposição à luz, o contacto com o ar atmosférico e com metais de transição [1,2,10,11].

Esmagar ou macerar tecidos, animais ou vegetais, desencadeia a lipólise porque as enzimas lipolíticas – lipases- são libertadas, e actuam nos lípidos para libertar os ácidos gordos livres como se mostra na figura 3 [1,10].

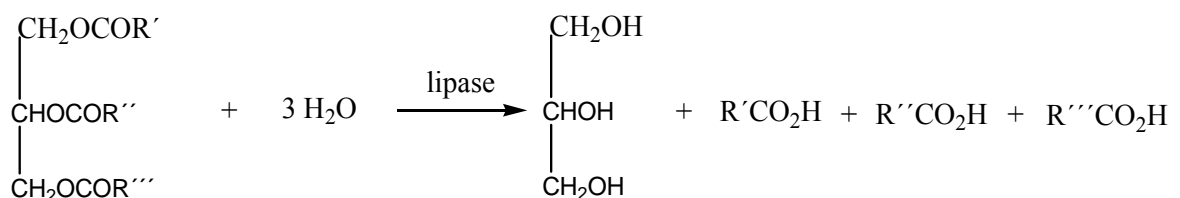


Figura 3 - Degradação de um lípido por acção de enzimas lipídicas [10].

Os ácidos gordos livres e os triglicerídeos são capazes de ser oxidados por auto-oxidação ou por enzimas chamadas lipoxigenases. A oxidação ocorre, principalmente, nos

ácidos gordos insaturados, dos quais o ácido oleico, linoleico e o linolénico, representados na figura 4, são os mais abundantes [10].

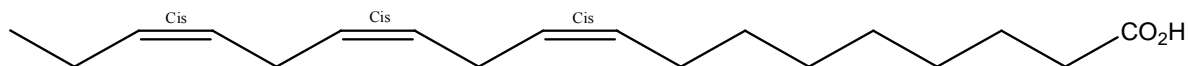
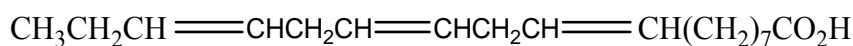
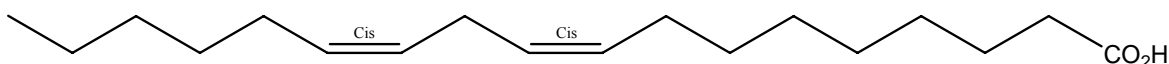
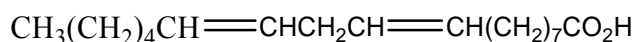
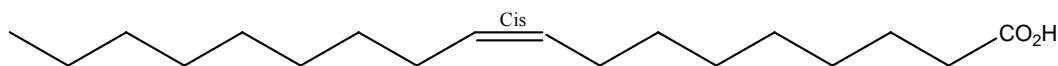
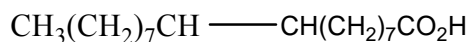


Figura 4 – Representação dos ácidos gordos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3) (adaptado da referência 10).

Sabe-se que o primeiro produto da oxidação é um intermediário, o qual não tem odor, mas pode quebrar-se em moléculas mais pequenas que produzem um mau odor [1,2,10,11]. Na auto-oxidação, sabe-se que os três ácidos gordos insaturados são oxidados a diferentes velocidades. O ácido linoleico é oxidado com uma velocidade 64 vezes maior do que o ácido oleico, e o ácido linolénico é oxidado com uma velocidade 100 vezes maior do que o ácido oleico [10].

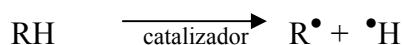
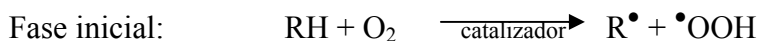
A produção de um intermediário pode ocorrer por um de dois mecanismos: o mecanismo de radical livre, o qual pode ocorrer no escuro, ou pelo mecanismo de foto-oxidação, que é iniciado pela exposição à luz. Em ambos os casos o intermediário é um lípido hidroperóxido [10,12,13,14].

3.1 Rancidez oxidativa ou auto-oxidação: Formação de Hidroperóxidos

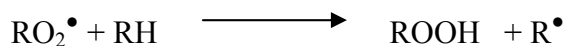
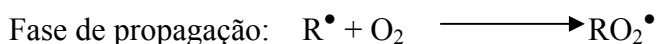
3.1.1 Mecanismo de radical livre

A rancidez oxidativa é um processo que ocorre geralmente em três fases: a fase inicial, a fase de propagação e a fase terminal [9,11,13,14].

Durante a fase inicial, a molécula de oxigénio reage com os lípidos ou ácidos gordos insaturados (RH), produzindo hidroperóxidos ($\bullet\text{OOH}$) e radicais livres ($\text{R}\bullet$), ambos bastante reactivos. Nesta fase, são geralmente necessários oxidantes, como por exemplo, metais de transição (Fe e Cu), ou enzimas (ex. lipoxigenases). O calor e a luz também favorecem o aumento da velocidade desta fase ou de outras fases de oxidação lipídica [2,13,14].



Os produtos desta fase inicial vão reagir com moléculas lipídicas adicionais de forma a originar outras espécies químicas reactivas – peróxidos ($\text{RO}_2\bullet$) que podem reagir dando origem a hidroperóxidos (ROOH) [2,13,14].

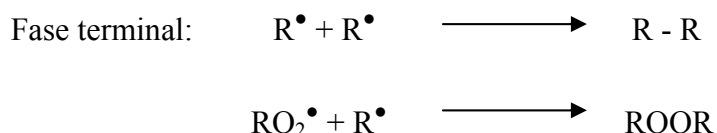


O primeiro produto da oxidação é um intermediário, hidroperóxido, praticamente sem odor, mas que ao longo do tempo se vai partindo em moléculas mais pequenas que produzem o mau cheiro (moléculas voláteis) [1,2,10,11].

A segunda reacção de propagação também tem um radical livre $\text{R}\bullet$ que faz a sua própria cadeia de propagação [10,14].

A cadeia de auto-propagação pode ser parada por reacções terminais, onde dois radicais se combinam e dão origem a produtos que não prosseguem as reacções de propagação.

Na fase terminal da oxidação lipídica são geralmente formados compostos não reactivos, incluindo hidrocarbonetos, alcóois, aldeídos e cetonas [9,10,11,12,13].



Quando este tipo de mecanismo é aplicado na auto-oxidação do oleato de metilo, figura 5, pode ser visto que a perda do hidrogénio no carbono 8 e no carbono 11 forma dois radicais alílicos, podendo cada um ser representado por duas formas canónicas. Tais formas canónicas permitem explicar porque é que não se obtém só o 8-hidroperóxido mas ainda porque é que se obtém também o 10-hidroperóxido, a partir de um radical alílico, e obtém ainda o 9 e 11-hidroperóxidos a partir de outro radical alílico [10].

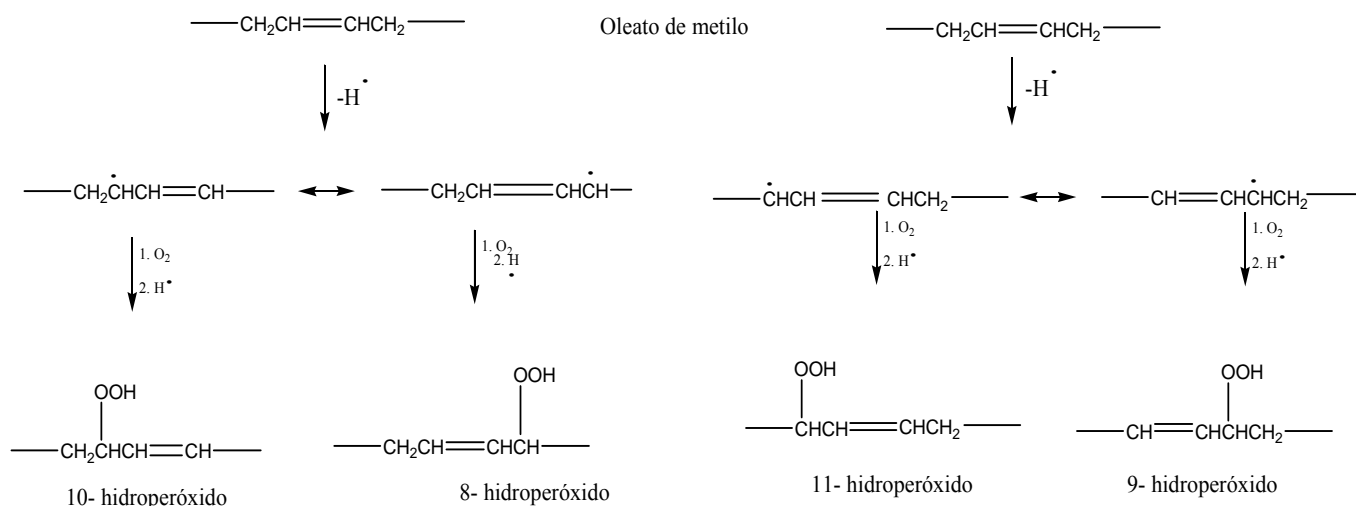


Figura 5 – Auto-oxidação do oleato de metilo (adaptado da referência 1).

Durante a fase inicial, a oxidação decorre com uma velocidade lenta e uniforme. Quando atinge um certo ponto, a reacção entra numa segunda fase, sofrendo uma

aceleração. A gordura começa a cheirar a ranço a partir do início da segunda fase, apesar dos especialistas conseguirem notar modificações na gordura ainda antes da segunda fase. À fase inicial chama-se período de indução [10].

3.1.2 Mecanismo de foto-oxidação

A foto-oxidação é conhecida como uma alternativa ao mecanismo de radical livre, podendo originar hidroperóxidos diferentes na presença da luz e de algumas moléculas fotossensíveis. Com estas oxidações não é conhecido nenhum período de indução [10].

3.1.3 Mecanismo da lipoxigenase

A química básica da reacção de oxidação da lipoxigenase é a mesma que a da auto-oxidação. Como acontece com outras reacções enzimáticas, a lipoxigenase é muito específica por causa do substrato e de como o substrato é oxidado, sendo o ácido linoleico oxidado nas posições 9 e 13.

A lipoxigenase prefere os ácidos gordos livres como substratos, embora existam isoenzimas lipoxigenases que reagem com os triglicéridos [10].

Qualquer um dos três mecanismos: o mecanismo de radical livre, o mecanismo de foto-oxidação e o mecanismo de lipoxigenase, levam à formação de hidroperóxidos que são relativamente não voláteis e não produzem maus cheiros. Contudo a conversão dos hidroperóxidos em componentes finais com cheiro é menos compreendida do que a produção dos hidroperóxidos.

3.1.4. Produtos de reacção secundária

Os lípidos hidroperóxidos são muito instáveis e partem-se num radical alcoxi livre que se decompõe, principalmente pela clivagem de qualquer dos lados do átomo de carbono que contém o átomo de oxigénio.

Na figura 6 apresenta-se esquematicamente os produtos secundários que se podem obter:

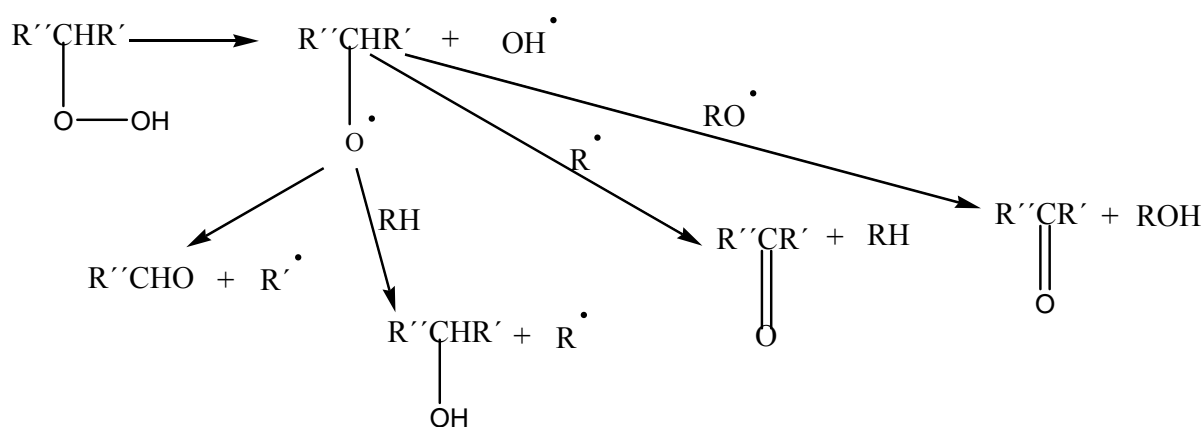


Figura 6 – Produtos secundários da rancidez oxidativa [10].

➤ Aldeídos

O mecanismo de clivagem do radical alcoxi livre depende da clivagem de qualquer lado do átomo de carbono que contém o átomo de oxigénio. Os dois electrões ímpares produzidos podem formar a dupla ligação do grupo carbonilo.

A figura 7 ilustra a formação de um aldeído, o hexanal.

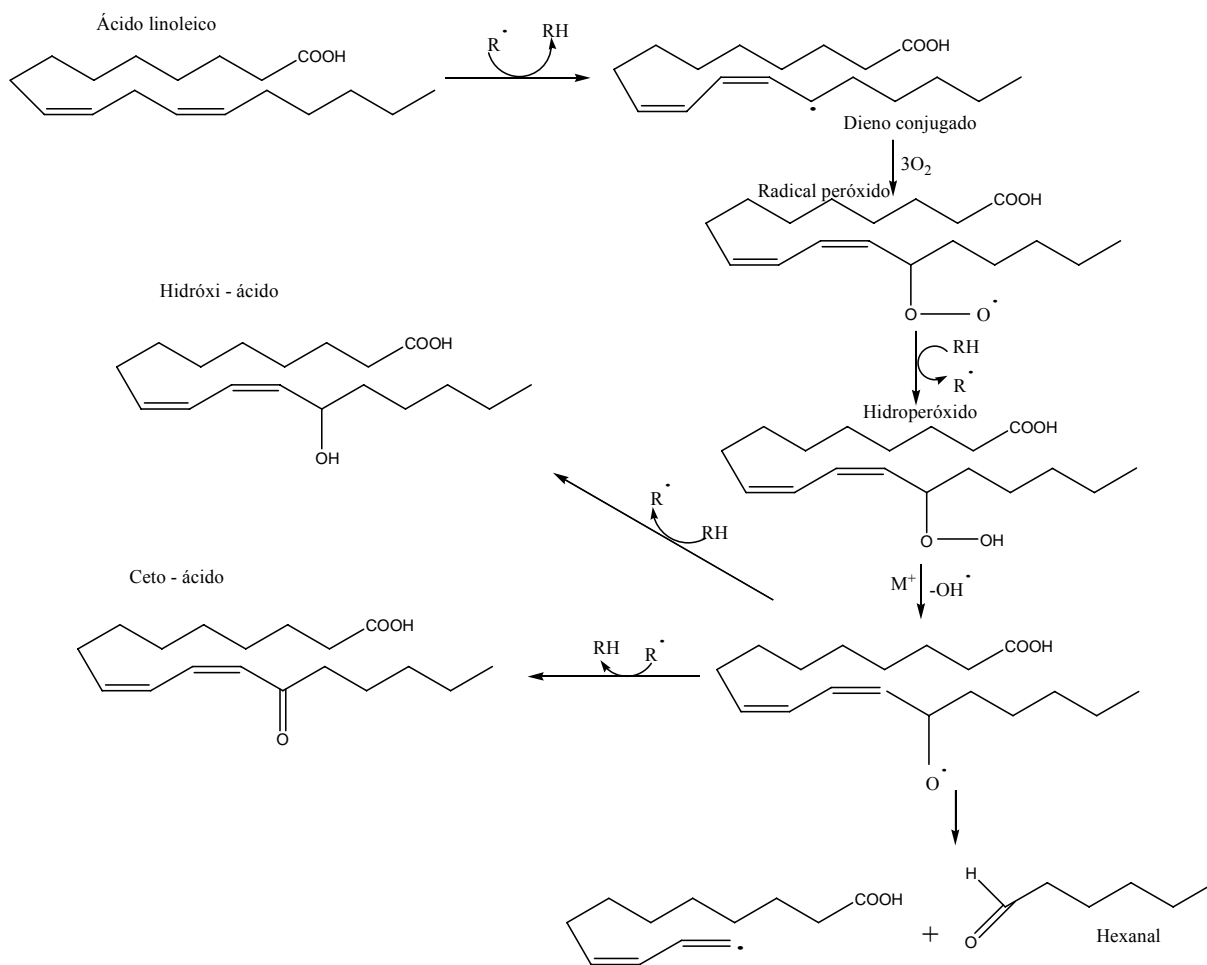


Figura 7 – Peroxidação do ácido oleico, originando um aldeído, hexanal (adaptado da referência 14).

Obviamente que com a gama de hidroperóxidos disponível existem muitos aldeídos que podem ser produzidos.

➤ Alcóois

Os alcóois podem ser formados por um mecanismo semelhante ao dos aldeídos. O radical alcoxil livre cliva para dar origem a um aldeído e um radical livre hidrocarboneto o qual pode captar um radical OH^\bullet para dar um álcool ou alternativamente captar um radical H^\bullet para formar um hidrocarboneto, como mostra a figura 8.

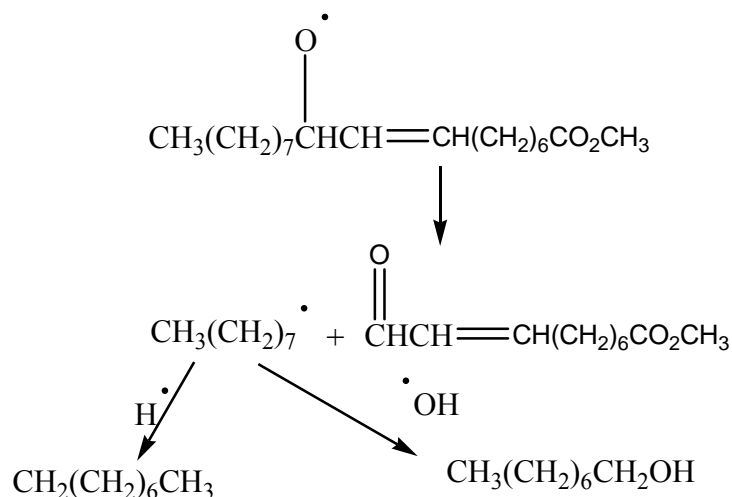


Figura 8 – Formação de um álcool e de um hidrocarboneto a partir de um radical alcoxi livre [10].

➤ **Hidrocarbonetos**

É possível postular mecanismos semelhantes aos dos aldeídos e alcóois para os hidrocarbonetos. Para além desses mecanismos, se considerarmos que o radical H^\bullet é captado de $\text{R}'\text{H}$, pode formar-se um novo radical R'^\bullet com o resultado das reacções da figura 9 poderem acontecer:

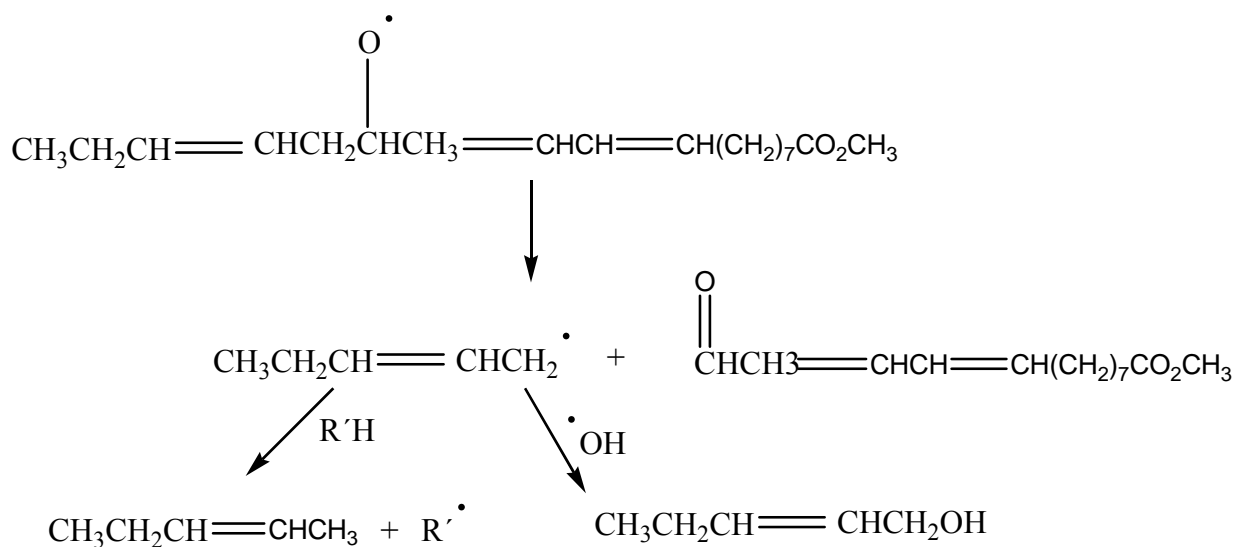


Figura 9 – Formação de álcool e de um hidrocarboneto a partir de um radical alcoxi [10].

3.2 Rancidez hidrolítica

Os três grupos de moléculas- aldeídos, alcóois e hidrocarbonetos- surgem a partir dos hidroperóxidos produzidos pela foto-oxidação ou pelo mecanismo clássico da auto-oxidação [10].

As cetonas metiladas, as lactonas e os ésteres podem ser formados principalmente por reacções hidrolíticas [10]. Assim, a molécula de triglicerídeo, sob acção de calor e humidade, na presença de um catalisador ou pela acção das enzimas lipases pode quebrar-se em ceto ácidos, os quais perdem rapidamente uma molécula de dióxido de carbono, figura 10, ou dar origem a lactonas, figura 11.

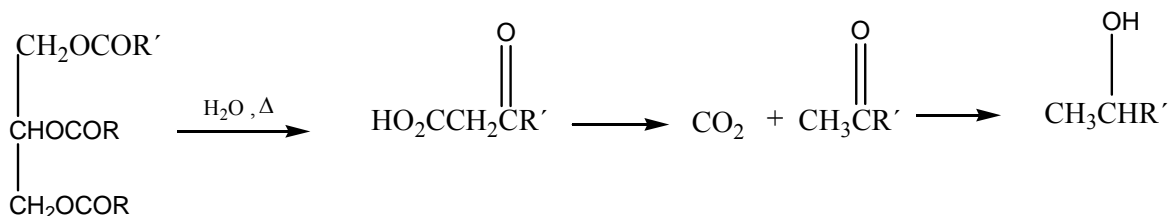


Figura 10 –Reacção hidrolítica [10].

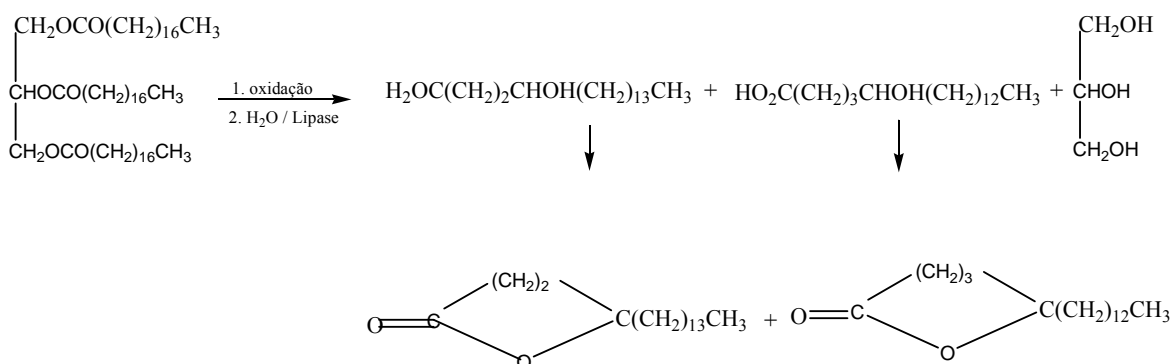


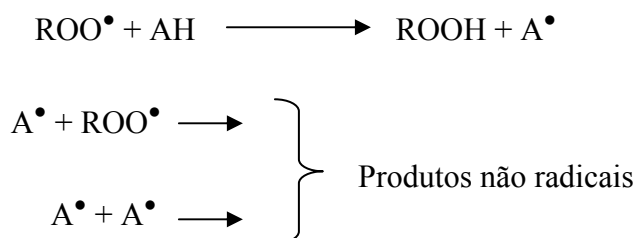
Figura 11 - Degradação de um lípido, numa reacção hidrolítica, originando lactonas [10].

Sabe-se ainda que as reacções hidrolíticas, incluindo a lipólise, proporciona os ácidos gordos livres oleico, linoleico ou linolénico, os quais podem sofrer mais rapidamente a auto-oxidação [10].

As metil cetonas podem ainda ser produzidas por microorganismos na presença de água [10].

3.3. Antioxidantes

A auto-oxidação pode ser inibida ou retardada pela adição de um antioxidante (AH), de baixa concentração, o qual pode interferir quer na cadeia de auto-propagação quer na iniciação [10]:



O radical livre A^\bullet originado pelo antioxidante é estabilizado por ressonância e portanto não participa nos passos de propagação.

Os antioxidantes usados na indústria alimentar são fenóis, por exemplo, hidroxianisole butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e a hidroquinona butilada (TBHQ) [10,15,16]. Estes compostos perdem a sua eficiência a altas temperaturas porque os hidroperóxidos formados anteriormente partem-se [10].

Existem, também, antioxidantes preventivos, os quais actuam reduzindo a velocidade da cadeia de iniciação, por exemplo, os metais inactivadores, os quais se coordenam com os iões metálicos capazes de catalisar a reacção de iniciação. São antioxidantes preventivos os ácidos cítrico, fosfórico e ascórbico [10].

Finalmente existe um sinergismo, que é o efeito obtido quando dois destes estabilizadores são usados juntos. A mistura dos dois tem um melhor efeito que qualquer um dos estabilizadores sozinhos. Se um antioxidante “quebrador de cadeia” e um antioxidante preventivo forem misturados, tanto a iniciação como a propagação são suprimidas [10].

Assim, a vitamina E e a vitamina C (ácido ascórbico) actuam juntas para remover os radicais livres gerados pelos radicais dos ácidos gordos insaturados.

Tendo em conta os diversos mecanismos da degradação da manteiga, esperar-se-á encontrar: hidroperóxidos, peróxidos, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, alcóois e ácidos gordos livres. Contarini *et al* [17] identificaram alguns dos compostos resultantes da degradação da manteiga, sendo os mais importantes: o ácido butanóico, a 2-pentanona, a 2-heptanona, a 2-nonanona e a 2-undecanona.

3.4. Efeitos da degradação da manteiga na apreciação por parte do consumidor

A manteiga tem, na sua composição uma variedade de compostos voláteis, muitos dos quais provenientes do próprio leite [2,3].

O cheiro da manteiga salgada e da manteiga ácida tem sido bem aceite. Os compostos químicos responsáveis são derivados [2]:

- da gordura do leite, na forma de ácidos gordos de pequena cadeia ou lactonas, cetonas e outros compostos que se desenvolvem durante uma suave oxidação;

- dos fosfolípidos da membrana globular da gordura;

- da acção bacteriana na produção da nata, por exemplo, o ácido láctico e diacetilo.

A variação do cheiro da gordura do leite, entre países, pode ser atribuída aos compostos com cheiro derivados da alimentação da vaca. A alimentação varia de país para país, tendo em conta factores geográficos, climáticos e económicos. O tipo de pastagem pode influenciar o cheiro da gordura do leite. Para além disso, existem zonas onde na maior parte do ano o clima é muito frio para promover o crescimento de pasto, então durante este tempo os animais são mantidos no interior e são alimentados à base de cereais e silagem. Noutras partes do mundo também se utiliza carne de soja como alimento porque é barata quando comparada com o pasto [2,3].

Outros compostos com cheiro são formados devido à acção de enzimas sobre os lípidos e à oxidação dos mesmos. Os processos de lipólise e oxidação dão origem a alguns componentes com cheiro agradável, mas em grande extensão produzem cheiros desagradáveis e ranço [2,8]. Na verdade, alguma rancidez é apreciada em certos mercados, mas quando o nível de ácidos gordos livres aumenta 10% do seu valor, o valor da manteiga já decresce no mercado [1]. As metil cetonas são responsáveis pelo cheiro característico de cozinhados com manteiga, ou da própria manteiga aquecida [9].

Os ácidos gordos já existentes na manteiga bem como aqueles que, em conjunto com outros compostos, resultam da degradação da mesma, e que apresentam cheiros característicos, são listados na tabela 4. Os compostos presentes na tabela 4 foram seleccionados por terem sido detectados experimentalmente durante a realização deste trabalho.

Tabela 4 - Cheiros característicos dos produtos resultantes da degradação da manteiga.

Compostos resultantes da degradação da manteiga	Cheiro
Ácido propanóico	ranço, acre [18]
Ácido butanóico	ranço, acre, queijo, podre, azedo [18], suor [18, 19] manteiga [19]
Ácido pentanóico	podre, fecal, suor e ranço [18]
Ácido hexanóico	repugnante, suor, ranço, queijo, gorduroso [18], acre [18,19], bolor [19]
Ácido acético	forte, odor penetrante e irritante a azedo [18,19]
2-propanona	maça, pêra, uva, ananás, etéreo [18]
2-butanona	etéreo [18]
2-pentanona	doce, etéreo, fruta [18]
2-heptanona	fruta, picante, canela [18], amêndoa rançosa [10]
2-nonanona	fruta, flores [18], aguarrás [10]
2-undecanona	odor citrino, a rosa [18], aguarrás [10]
1-hexanol	verde [20], herbáceo, madeira, suave, doce [18]
3-hidroxi-2-butanona	manteiga [18,22], transportador de aromas usado na preparação de essências [21]

3.5. Efeitos da degradação da manteiga na Saúde

Os lípidos constituem um dos grupos de compostos orgânicos vitais para os organismos [4]. Destacam-se as seguintes funções:

- ⇒ Reserva energética;
- ⇒ Função estrutural;
- ⇒ Função protectora;
- ⇒ Função vitamínica e hormonal.

O funcionamento correcto do nosso organismo depende muito da presença de vários lípidos. A maior parte é sintetizada no nosso organismo, a partir de produtos da digestão, mas os poucos que não conseguimos sintetizar devem estar presentes na nossa dieta, por exemplo, certos ácidos gordos poliinsaturados (linoleico e linolénico) [2,23]. Estes compostos estão em cada célula do nosso organismo, e desempenham um papel importante no funcionamento das membranas celulares e também nos mecanismos de coagulação do sangue [2].

A digestão das gorduras produz componentes que não são solúveis em água mas que têm que ser transportados no meio aquoso do sangue para outras partes do organismo. Para conseguir isto o organismo produz uma gama de colesterol contendo lipoproteínas que emulsionam o material lipídico, deixando as superfícies proteicas hidrofílicas em contacto com o sangue [2, 3].

O mau funcionamento de qualquer um destes sistemas no organismo conduz a doenças tais como arterioesclerose, trombozes, derrames cerebrais, doenças de coração ou cancro. Daí que tenham sido estabelecidas ligações entre a ingestão de gorduras e o risco de certas doenças. Criou-se ainda a ideia de que as gorduras saturadas são as prejudiciais, enquanto que as poliinsaturadas são as “boas”. Na realidade, esta é uma visão simplista e nem todas as gorduras saturadas se comportam da mesma maneira, e sabe-se mesmo que níveis elevados de poliinsaturados podem ter efeitos negativos [2, 3].

Estes conceitos que ligam as gorduras saturadas a problemas de saúde, subsistem nos dias de hoje, e são responsáveis pela quebra no consumo de manteiga que se tem registrado de há vinte anos para cá [2].

Descobertas mais recentes sugerem que os monoinsaturados, anteriormente considerados neutros em termos de saúde, podem ter uma contribuição positiva. Para além disto, algumas descobertas sugerem que os lípidos oxidados podem danificar tecidos e, uma vez que os monoinsaturados são mais estáveis à oxidação do que os poliinsaturados, níveis elevados daqueles na nossa dieta podem apresentar menos riscos [2].

Nem todos os ácidos gordos saturados são igualmente perigosos. Os ácidos palmítico, láurico e mirístico elevam os níveis de colesterol LDL no sangue. Efeito similar é causado pela ingestão de gorduras hidrogenadas (constituídas por ácidos gordos insaturados, na forma *trans*), contidas nas margarinas, manteigas e banhas de origem animal ou vegetal. Para além disso, os ácidos gordos insaturados na forma *trans* reduzem os níveis de colesterol HDL ("colesterol protector"), podendo aumentar os riscos para a saúde [6,23]. As gorduras saturadas são encontradas no óleo de coco, chocolate, ovos, carne, leite, manteiga, banha, biscoitos, batatas fritas e bolachas. Os ácidos gordos insaturados na forma *cis* podem contribuir para o aumento do colesterol HDL. Assim, a degradação destes ácidos e sua transformação em ácidos saturados é prejudicial, sendo importante o controlo da mesma nos produtos alimentares [23].

A manteiga contém aproximadamente 0,2% de colesterol. Uma típica fatia de manteiga contém 11 mg de colesterol. Recomendações correntes para dietas que visam reduzir o colesterol recomendam não ingerir mais que 300 mg/dia. A manteiga é uma das poucas gorduras com algum valor nutricional e por isso faz parte de uma dieta saudável [7].

4. Métodos para quantificar a degradação da manteiga

Qual a melhor maneira para quantificar o ranço numa amostra?, esta é uma pergunta muito frequente, mas que ainda, infelizmente, não tem uma única resposta.

Muitos factores têm de se ter em conta quando se selecciona o(s) teste(s) mais apropriado(s), para além de ser difícil prever qual o método que dará melhores resultados. O ranço poder ser quantificado através de dois métodos: sensorial e químico [12].

Os testes químicos podem objectivamente quantificar vários produtos da oxidação lipídica, enquanto que as avaliações sensoriais, subjectivas, podem ser a chave para identificar o ranço.

A correlação com testes sensoriais é a base para determinar quais os testes químicos apropriados para medir a oxidação lipídica de qualquer produto.

4.1 Método sensorial

A qualidade sensorial de uma dada amostra tem de ser avaliada por um painel de especialistas, com muita experiência, que usam análises descritivas [12]. Todo este trabalho tem de ser realizado num laboratório sensorial que cumpra todos os pré-requisitos que têm de estar de acordo com os padrões internacionais ISO (International Organization for Standardization). Antes de se fazerem quaisquer avaliações, todos os especialistas tem de passar o teste básico de sabor (de acordo com as normas ISO), o teste básico do odor e o teste básico da visão.

Estes especialistas têm de ser treinados nos métodos sensoriais em diversas sessões ao longo de alguns anos e a sua capacidade de avaliação é verificada de “tempos a tempos” através do uso de cartões individuais para cada especialista.

A análise sensorial consiste na avaliação do sabor, do cheiro e da cor da amostra, por parte de um conjunto de especialistas que obedecem aos parâmetros referidos anteriormente.

4.2 Métodos químicos

Os métodos químicos podem consistir em testes de previsão da resistência à rancidez e testes indicadores de rancidez.

4.2.1. Testes de previsão da resistência à rancidez

- ❖ **Teste do forno de Schaal** – este teste consiste no aquecimento de 50 – 100 g de uma amostra num prato aberto e guardá-lo num forno termostatizado até a rancidez começar. A temperatura à qual a gordura é mantida é 63 ± 0.5 °C ou 70 °C. As amostras são examinadas, geralmente através do cheiro ou do sabor, em intervalos regulares, por exemplo diariamente ou semanalmente, dependendo da velocidade de deterioração. Alternativamente, o decorrer da oxidação pode ser seguido pela determinação de factores químicos como o valor de peróxidos (VP). Este teste tem como principais desvantagens a sua natureza subjectiva e exigir uma limpeza muito cuidadosa do equipamento para evitar que quaisquer resíduos deixados pela sua utilização anterior possam catalisar a oxidação da amostra [10].

- ❖ **Teste de Sylvester** – neste teste uma amostra de gordura é colocada num recipiente fechado, o qual é aquecido até 100 °C num banho termostatizado com agitação contínua. O oxigénio do ar reage lentamente com o óleo, o qual fica oxidado, conduzindo a uma redução da pressão do frasco. Esta diminuição de pressão pode ser monitorizada e representada ao longo do tempo num gráfico. Ao início a oxidação é lenta devido à resistência natural do óleo à oxidação, mas quando esta se esgota a oxidação torna-se progressivamente mais rápida. O gráfico do oxigénio absorvido em função do tempo mostra uma quebra pronunciada no final do período de indução. Um problema com muitos destes sistemas é a necessidade de uma agitação contínua ao longo do teste. Algumas gorduras têm períodos de indução de 200h ou mesmo de 400h, e torna-se difícil garantir uma agitação constante durante tempos tão longos. É no entanto de realçar que o método de medição do oxigénio absorvido se correlaciona melhor com o teste de armazenamento do que os resultados obtidos com os métodos do oxigénio activo, como por exemplo o teste de Swift [10].

- ❖ **Instrumento FIRA-Astell** – este aparelho foi desenhado para a determinação de oxigénio absorvido por óleos e gorduras, medindo a queda de pressão num balão de teste. Embora o instrumento FIRA-Astell tenha sido uma considerável melhoria em relação às primeiras técnicas e conseguisse produzir resultados fiáveis com uma manutenção cuidada, tinha vários inconvenientes. Em particular, o agitador era pouco fiável e as fugas eram normalmente um problema, num instrumento que se baseava em medições de pressão. Como resultado, em parte, destes problemas o fabrico deste instrumento cessou [10].

- ❖ **“Oxidograph”** – como referido anteriormente, o instrumento FIRA-Astell tem algumas desvantagens e não é mais fabricado. Contudo, o princípio em que se baseava é atractivo e os resultados parecem relacionar-se melhor com outros testes de armazenamento do que outros métodos baseados no oxigénio activo. Além disso, os métodos de absorção do oxigénio dão resultados válidos quando o óleo ou gordura contém antioxidantes voláteis como, por exemplo, hidroxianisole butilado (BHA) ou hidroxitolueno butilado (BHT). Em parte por estas razões, a companhia Grindsted na Dinamarca desenvolveu o instrumento “Oxidograph”. O aparelho consiste num termóstato; num bloco de alumínio electricamente aquecido, no qual seis buracos foram feitos para acomodar seis balões de reacção; num agitador magnético; em seis transdutores, os quais estão ligados aos balões de reacção por um tubo de plástico estreito e que convertem mudanças de pressão em sinais eléctricos; e num registador automático, o qual recebe sinais eléctricos dos transdutores e traça um gráfico das mudanças de pressão *vs* tempo. Em alguns testes no Leatherhead Food RA, o “Oxidograph” mostrou ser capaz de produzir resultados fiáveis e valores para o período de indução comparáveis com outros antecipados por outros trabalhos. Em particular, este instrumento deu valores reais para óleos e gorduras contendo antioxidantes voláteis como o BHA e BHT, ao contrário de outros testes de estabilidade acelerada, nos quais o ar passa pelo óleo e o antioxidante é rapidamente varrido do óleo às elevadas temperaturas às quais são conduzidas as experiências. Também se verificou que o “Oxidograph” dá valores credíveis para amostras já voláteis. Este instrumento

tem ainda a vantagem de ser simples, dos recipientes de vidro serem de fácil limpeza e de serem baratos de se adquirir em caso de quebra [10].

- ❖ **Método do oxigénio activo ou teste Swift (MOA)** – este método prevê a estabilidade da gordura através do borbulhar de ar numa solução de gordura usando condições específicas de caudal, temperatura e concentração. Posteriormente, os peróxidos e hidroperóxidos produzidos por este tratamento são determinados por titulação com iodo. O valor de MOA é definido como o número de horas necessárias para a concentração de peróxidos alcançar 100 meq/kg de gordura. Quanto mais estável a gordura, mais tempo demorará a atingir esse valor. Para produtos que não sejam gorduras e óleos, as gorduras têm de ser cuidadosamente extraídas com solventes. Este método é muito demorado, pois a gordura pode requerer 48 horas ou mais até atingir a concentração de peróxidos necessária. Este método está incluído numa compilação publicada pelo AOAC (American Organization for Analytical Chemistry), AACC (American Association for Clinical Chemistry) e AOCS (American Oil Chemists Society) [8]. O método é empírico e é preciso seguir muito estreitamente o procedimento de forma a obter resultados reprodutíveis [10,11].

- ❖ **Instrumento Rancimat** – este método é muito parecido com o MOA, mas é mais rápido e mais automático. Após passagem do ar através da amostra, é borbulhado num reservatório de água desionizada. Os ácidos voláteis produzidos pela oxidação lipídica são dissolvidos na água aumentando a sua condutividade que é medida entre dois eléctrodos de platina. Existe um aparelho comercial, instrumento Rancimat, comercializado pelo Metrohm of Basle. Tem algumas vantagens em relação aos instrumentos FIRA-Astell e “Oxidograph”, mas também algumas desvantagens. Nas duas situações os gráficos dos períodos de indução têm características semelhantes, notando-se que por vezes atingem um máximo e descem de seguida. No teste Rancimat, o fluxo de ar pode retirar os ácidos dissolvidos da água destilada, conduzindo a uma redução das suas concentrações e a um aumento da resistência eléctrica da água. No teste FIRA-ASTELL/”Oxidograph” este facto deve-se à evolução de compostos voláteis do óleo, provocando um aumento da pressão para compensar o decréscimo resultante da absorção do oxigénio [10].

- ❖ **Índice de estabilidade dos óleos – instrumento “OSI”** – partindo do sucesso do instrumento Rancimat na Europa, um instrumento alternativo foi desenvolvido pela Companhia Archer Daniels, Illinois, EUA. Este foi designado pelo instrumento OSI, e é usado para determinar o índice de estabilidade do óleo, outro nome para o período de indução, excepto que é agora definido como o máximo na segunda derivada da condutividade com respeito ao tempo. Isto corresponde à inclinação máxima da curva do período de indução. O instrumento OSI trabalha sob os mesmos princípios do instrumento Rancimat, no entanto, algumas modificações foram introduzidas de forma a ultrapassar alguns problemas encontrados no instrumento Rancimat. Uma das alterações é a substituição dos tubos de reacção por tubos de vidro descartáveis, que vem diminuir os problemas com a limpeza e usa sensores eléctricos mais robustos e com maior tempo de vida. Este instrumento foi aprovado pela AOCS [10].

- ❖ **Número de Iodo** – embora não seja uma medida específica da estabilidade da gordura, a medição do número de iodo pode indicar o potencial de uma gordura para ser oxidada. O método mede a reacção do iodo com as duplas ligações dos ácidos gordos insaturados. Ácidos gordos com um grande número de ligações duplas proporcionam mais sítios de oxidação. O número de iodo só por si não é muito útil para prever a estabilidade da gordura, porque existem outros factores que podem influenciar a estabilidade da mesma [11].

4.2.2. Testes indicadores da rancidez

4.2.2.1. Medição da rancidez oxidativa

Em comparação com a rancidez hidrolítica, a rancidez oxidativa é mais complexa e aquela que tem sido objecto de mais pesquisa. É causada pela oxidação da gordura, obtendo-se intermediários que incluem hidroperóxidos e peróxidos, que conduzem ao aparecimento de aldeídos e cetonas, bem como a outros produtos mais pequenos. Estes

produtos de oxidação secundária, especialmente os aldeídos, têm maus cheiros associados aos óleos rançosos. Como os primeiros produtos formados pela oxidação de um óleo são peróxidos ou hidroperóxidos, o método mais comum de medição é o do valor de peróxido (VP), o qual é expresso em unidades de miliequivalentes de oxigénio por quilograma de gordura [10].

- ❖ **Valor de peróxidos** – é um dos testes mais usados para a rancidez oxidativa. O valor de peróxidos é a medida da concentração de peróxidos e de hidroperóxidos formados numa fase inicial da oxidação lipídica. Miliequivalentes de peróxido por kg de gordura são medidos por titulação com o ião iodeto. Os valores de peróxidos não são estáticos e são necessários cuidados especiais na manipulação e durante os testes com as amostras. É difícil relacionar o valor de peróxidos com a rancidez. Valores de peróxidos muito altos são uma indicação segura da presença de ranço na amostra, mas valores moderados podem ser o resultado de um esgotamento de peróxidos depois de se terem atingido altas concentrações [10,11]. Sabe-se que as duas principais fontes de erro neste método são: a absorção de iodo nas ligações insaturadas dos ácidos gordos e a libertação do iodo adicional do iodeto de potássio pelo oxigénio presente na solução. A AOCS padronizou um procedimento para a determinação do VP, no método Cd 8-53, e é aplicável a todos os óleos e gorduras. Assim como com os outros métodos, é altamente empírico e qualquer variação no procedimento pode levar a imprecisões no resultado [10,11].

- ❖ **Valores de anisidina (VA)** – quando os hidroperóxidos se quebram, eles produzem aldeídos voláteis, como por exemplo o hexanal, deixando para trás uma quantidade de ácidos gordos não voláteis que permanece como uma parte da molécula do glicerídeo. O produto não volátil desta reacção pode ser medido através da reacção com a anisidina. Valores altos de anisidina podem ser uma indicação de que a gordura foi oxidada, mesmo quando ATB e outros testes de aldeídos dão resultados baixos porque os aldeídos voláteis podem acidentalmente ou intencionalmente ser removidos durante o processamento. O valor de anisidina é definido como 100 vezes a absorvância (a 350

nm) de uma solução resultante da reacção de 1g de gordura em 100 mL de solvente [10,11]. Este é um método reconhecido pela IUPAC [10].

- ❖ **Valor “totox”** – o valor da anisidina é frequentemente usado em conjunto com o valor de peróxidos para calcular o valor da oxidação total ou valor “totox”: valor “totox” = $2VP + VA$. Nesta equação ao valor de PV é dado um o peso a dobrar, pois como Holm e Ekbohm descobriram experimentalmente, quando um óleo é aquecido a 200 °C sob vácuo, 1 unidade de PV é decomposta para dar um aumento de 2 unidades de VA. Patterson deu uma aplicação racional para esta questão dizendo que os peróxidos têm dois oxigénios por molécula enquanto que os aldeídos só têm um. Empiricamente pode dizer-se que o valor “totox” deve ser inferior a 10 [10].

- ❖ **Testes do ácido tiobarbitúrico (ATB)** – este teste é outro método empírico frequentemente usado para a oxidação lipídica. Aldeídos saturados, 2-enais e 2-dienais, produzidos na fase terminal da oxidação lipídica, podem ser detectados pela reacção com o ácido 2-tiobarbitúrico. A reacção produz uma cor vermelha que pode ser medida usando um espectrofotómetro. Embora originalmente desenvolvido para detectar malonaldeídos, está provado que o TBA reage com outros aldeídos, bem como com substâncias interferentes como os fenóis. Tal como os valores de peróxidos, um baixo valor de TBA não é um indicador absoluto da qualidade da gordura, sendo possível que os aldeídos ainda não se tenham formado ou que os mais voláteis se tenham perdido durante o processamento e o armazenamento [10,11].

- ❖ **Teste de Kreis (índice de rancidez)** – o teste de Kreis tem a vantagem de ser rápido e também dá uma indicação da rancidez incipiente. Foi um dos primeiros testes usados para avaliar a oxidação das gorduras e envolve a produção de uma cor vermelha quando o floroglucinol reage com gordura oxidada em soluções ácidas. Desde cedo a literatura declarou que os compostos responsáveis pela reacção colorida de Kreis são os aldeídos epoxi ou os seus acetais. O teste pode ser usado de forma qualitativa mas também quantitativa apesar das amostras frescas produzirem, por vezes, em contacto com o reagente de Kreis uma coloração. Alguns aditivos como a anisidina também interferem no teste [10].

- ❖ **Técnicas espectrométricas** – quando o ácido linoleico é oxidado para formar o ácido linoleico hidroperóxido, as duplas ligações das gorduras tornam-se conjugadas. Este é também o caso quando o ácido linolénico é oxidado para ácido linolénico hidroperóxido. Os ácidos conjugados formados absorvem luz ultravioleta e o ácido linoleico hidroperóxido e os dienos conjugados que podem resultar da decomposição, mostram uma banda de absorção a 232 nm, enquanto que os produtos de reacção secundária e particularmente dicetonas mostram uma banda de absorção a 268 nm. Os trienos conjugados mostram uma banda de absorção tripla, na qual o pico principal está na vizinhança dos 268 nm, junto com um pico secundário a 278 nm [10].

- ❖ **Espectroscopia Infra-Vermelho** – é um método usado para medir a rancidez, mas a sua maior valia está no reconhecimento de grupos funcionais não usuais e no estudo de ácidos gordos com duplas ligações trans. O'Connor disse que o aparecimento de bandas a 2.93 μm era devido à formação de hidroperóxidos, enquanto que o desaparecimento de uma banda a 3.2 μm indicava a substituição de um hidrogénio na ligação dupla por outro qualquer radical livre. Isto pode indicar polimerização. Também é sugerido que o aparecimento de bandas adicionais a 5.72 μm , o qual está associado à elongação C = O, indica a formação de aldeídos, cetonas ou ácidos. Para além do mais, um aumento na banda de absorção a 10.3 μm indica a formação de duplas ligações trans adicionais, provavelmente devido às modificações causadas durante a oxidação [10].

- ❖ **Índice de refração** – medições do índice de refração têm sido usadas para medir a estabilidade da mistura do óleo de sésamo/soja, mas o principal atractivo das medições do índice de refração, de espectrometria ultravioleta/visível (UV) ou infra-vermelho (IV) está na sua associação com HPLC (High Performance Liquid Chromatography) [10].

- ❖ **Quimioluminescência e bioluminescência** – algumas técnicas baseadas na quimioluminescência e na bioluminescência têm sido utilizadas apesar da fraca emissão e da necessidade de equipamento sofisticado. Contudo, Miyazawa *et al.* aplicaram uma nova técnica de quimioluminescência para estudar a rancidez. Eles concluíram que o

método é versátil e rápido quando acoplado com a oxidação do luminol na presença do citocromo c e tem boa sensibilidade para ácidos gordos hidroperóxidos [10].

- ❖ **Método polarográfico** – estes métodos têm sido desenvolvidos para determinar lípidos oxidados. A gordura é dissolvida num solvente não-aquoso e os componentes oxidados são reduzidos num eléctrodo gotejante de mercúrio. No entanto, a polarografia parece ser uma área de pesquisa negligenciada quanto aos métodos de medição de rancidez [10].

- ❖ **Separação por Cromatografia líquida seguida de detecção** – a coluna líquida cromatográfica tem sido usada para separar material polar e não polar em óleos fritos, mas a principal atracção é no HPLC, uma vez que oferece a oportunidade de medir concentrações de peróxidos termicamente lábeis, hidroperóxidos e produtos da oxidação secundária voláteis e não voláteis [10].

- ❖ **Valor de hexanal** – o hexanal produzido durante a fase terminal da oxidação lipídica, pode ser medido através da análise por cromatografia gasosa do espaço de cabeça de uma amostra. Existem vários métodos, mas geralmente uma dada quantidade da amostra é moderadamente aquecida num frasco tapado com um septo. Uma seringa de gás é utilizada para retirar uma pequena porção do espaço de cabeça sendo esta amostra injectada numa coluna de GC para separar o hexanal dos restantes compostos voláteis. A concentração do hexanal pode depender de um grande número de factores, incluindo a história da amostra e a composição e quantidade da gordura. Geralmente são necessárias várias amostras do mesmo produto para estabelecer uma correlação entre a concentração de hexanal e a qualidade do produto. Uma vez estabelecida a correlação, a medição de hexanal pode ser um rápido e útil instrumento para a medição da oxidação lipídica [11].

- ❖ **Separação por Cromatografia Gasosa seguida de detecção** – tanto a injeção directa como a análise do espaço de cabeça têm sido utilizadas. Este método consiste na obtenção de um perfil dos compostos voláteis que existem no produto usando uma técnica semelhante à descrita anteriormente para o hexanal. A oxidação lipídica produz

uma variedade de compostos voláteis incluindo hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos. À medida que a oxidação aumenta, o total destes compostos voláteis tendem a aumentar e podem ser medidos injectando uma porção do espaço de cabeça num cromatógrafo de gás. Aromatizantes voláteis podem interferir e correlações de espaço de cabeça em amostras de qualidade conhecida são importantes [10,11].

4.2.2.2. Medição da rancidez cetónica

A rancidez cetónica é um problema frequente esquecido com comidas que contêm ácidos gordos saturados de cadeia pequena. Pode ser a causa dos maus cheiros no côco, mas pode surgir em outras comidas como a manteiga. Na presença de quantidades pequenas de água e oxigénio, fungos como o *Eurotium amstelodami* podem interagir com o ácido láurico, libertando inicialmente ácidos gordos livres de cadeia pequena, que são depois sujeitos a uma β -oxidação, dando origem a duas séries homólogas de compostos, chamados metilcetonas e álcoois alifáticos, ambos com cadeias de carbonos impares. Como o primeiro passo no desenvolvimento desta forma de rancidez é a hidrólise dos ácidos gordos de cadeia pequena, está muito relacionado com a rancidez hidrolítica discutida anteriormente. Contudo, visto que as metil cetonas e os alcóois alifáticos têm diferentes odores, cheiro a bolor e a estragado, distingue-se da rancidez lipolítica normal. A medição da rancidez cetónica é, por conseguinte, paralela à rancidez lipolítica, isto é, consiste na análise da humidade, da lipase e/ou da actividade microbiológica, bem como no conteúdo dos ácidos gordos livres. Para além disso, os voláteis podem ser destilados e analisados pelas séries homólogas de metil cetonas e alcóois alifáticos, ambos com cadeias de número impar de carbonos [10].

4.2.2.3. Medição da rancidez hidrolítica

Quando se suspeita da rancidez hidrolítica, existe três factores que podem ser medidos, nomeadamente a humidade, o agente catalisador e o nível de ácidos gordos livres. A humidade e o agente catalisador são os factores causadores da rancidez

hidrolítica, enquanto que os ácidos gordos livres, se presentes, são o resultado desta hidrólise.

A humidade pode ser medida pela quantidade volátil presente, mas também pelo Método Padrão BS 484. Uma alternativa é a titulação de Karl Fischer na secção 2.1 BS 684. Esta última é melhor para produtos que possam dar respostas enganadoras durante o aquecimento para avaliação da matéria total volátil.

A hidrólise raramente acontece na ausência de catalisador, sendo geralmente a enzima livre a lipase ou esterase. As lipases e esterases são determinadas pelo teste do acetato indoxilo, introduzido por Purr e desenvolvido posteriormente por Leatherhead Food RA. Neste teste, um papel de filtro embebido em acetato indoxilo é exposto numa pasta da amostra a analisar numa solução com pH fixo. A presença de alguma lipase na amostra causa a libertação dos radicais indoxilo, os quais oxidam e condensam tornando azul o papel durante uma incubação a 37° C. A coloração azul é facilmente vista e pode proporcionar uma comparação semi-quantitativa sob condições padrão [10].

Os ácidos gordos livres (AGL) numa amostra de gordura podem ser determinados por uma titulação [10,11]. O valor de AGL pode ser expresso em % de um ácido gordo no produto testado. Frequentemente, os valores são expressos como % de ácido oleico para o sebo e rebento de soja. Para os óleos de coco e para outro tipo de óleos que contêm um grande número de ácidos gordos de cadeias pequenas, AGL podem ser expressos como % de ácido láurico. AGL são uma indicação da rancidez hidrolítica, mas outros processos da oxidação lipídica podem também produzir ácidos. Será útil conhecer a composição dos ácidos gordos presentes na amostra para identificar a sua origem e perceber a causa da sua formação [11].

Devido à complexidade da oxidação lipídica, nenhum método por si só é suficiente. A selecção do método e a interpretação dos resultados requer uma colaboração cuidadosa entre os técnicos alimentares e o laboratório.

5. Sensor de massa para seguir a degradação da manteiga

A simplicidade do equipamento utilizado na maioria das experiências, e o seu baixo preço, bem como o custo reduzido e a facilidade de aquisição dos cristais, contribuem para tornar o método acessível. Além disso, experiências cuidadosamente controladas e planeadas mostram que a microbalança de cristais piezoelétricos é um método que além de ser sensível, pode atingir uma exactidão e uma precisão excelentes.

5.1 Cristais piezoelétricos

A piezoelectricidade consiste na propriedade que certos materiais possuem de, quando sujeitos a uma compressão, desenvolverem uma diferença de potencial à pressão aplicada, entre as superfícies deformadas [24,25]. A piezoelectricidade também pode consistir no efeito inverso, ou seja, na deformação mecânica dos materiais em resposta à aplicação de um campo eléctrico (isto é, de uma dada diferença de potencial) [26].

A microbalança de cristais piezoelétricos baseia-se no facto de uma variação de massa à superfície do cristal provocar uma variação proporcional na frequência de vibração. Desta forma, é fundamental que a espécie a detectar interaja com os eléctrodos depositados na superfície do cristal, de forma a fazer variar a massa sobre o mesmo. No caso dessa interacção não existir, ou ser insuficiente, reveste-se o cristal com um filme que adsorva ou absorva, tão especificamente quanto possível, o analito [26,27].

A piezoelectricidade ocorre em cristais que não possuem centro de simetria, dos quais se contam 21 classes, sendo 20 piezoelétricas [25,28,29].

O quartzo α é o cristal piezoelétrico mais usado graças à sua insolubilidade em água, ao facto de ser inerte, à sua resistência a temperaturas até 579°C sem perdas de propriedades piezoelétricas e ao seu excelente factor de qualidade (Q), que representa a razão entre a energia armazenada e a energia perdida, por ciclo, durante a oscilação, e garante a estabilidade da frequência [26].

A maior parte das propriedades de um cristal de quartzo são anisotrópicas, mas para caracterizar aquelas que dependem da direção, o cristal é descrito por um sistema de coordenadas, como se pode ver na figura 12, no qual o eixo principal de crescimento do cristal é o eixo z.

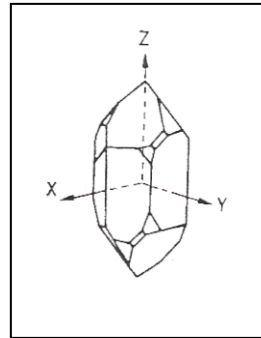


Figura 12 - Estrutura cristalina do quartzo com representação dos eixos coordenados [24].

O ângulo de corte em relação aos eixos cristalográficos faz variar o coeficiente de temperatura. Este é o eixo principal porque o factor determinante da frequência é a espessura, pois estudos anteriores verificaram que se o corte fosse feito no plano y-z, o campo eléctrico aplicado segundo o eixo dos x resultaria numa vibração longitudinal ao longo do eixo y, o que limitaria a frequência visto esta depender do comprimento, e neste caso, este ser muito pequeno [30]. No entanto, os primeiros trabalhos tinham interferências de harmónicas, então foram utilizados cristais com corte-Y vibrando no modo de cisalhamento.

Estes cristais deram bons resultados, com poucos modos de vibração interferentes mas eram sensíveis a variações externas de temperatura. Os coeficientes de temperatura e a constante de frequência variam com o ângulo de rotação. Existem dois ângulos de rotação com coeficientes de temperatura zero ou baixos: AT e BT, em relação ao eixo do z. O corte AT, representado na figura 13, é superior ao BT, relativamente ao coeficiente de temperatura e sensibilidade de massa, e é deste tipo o cristal utilizado neste trabalho. O coeficiente é de cerca de 1 ppm/°C na gama de temperatura de 10 a 50°C [24,31].

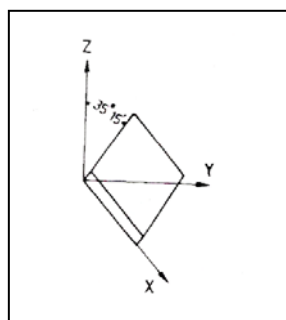


Figura 13 - Orientação do corte AT [24].

Na microbalança de cristal piezoelétrico de quartzo, usualmente designada por QMC (*Quartz Crystal Microbalance*), são depositados dois eléctrodos, um de cada lado da fina lâmina de quartzo. Estes eléctrodos são usados para a indução de um campo eléctrico que oscile perpendicularmente à superfície. Este campo eléctrico produz uma oscilação mecânica, uma onda estacionária ao longo do cristal. Apenas a região entre os eléctrodos é piezoelectricamente activa [24]. Uma vez que se utilizam cristais AT, a direcção de oscilação predominante na QMC é a de cisalhamento [26,27].

Sauerbrey e Lostis chegaram à conclusão que, para pequenas variações de massa, o decréscimo na frequência de vibração de um cristal, no seu modo de cisalhamento, que se observa com a deposição de um filme, é linearmente proporcional à massa depositada.

Sauerbrey desenvolveu uma relação entre a massa do filme depositado num cristal de quartzo AT, vibrando no modo de cisalhamento de espessura, como se representa na figura 14, e a variação de frequência.

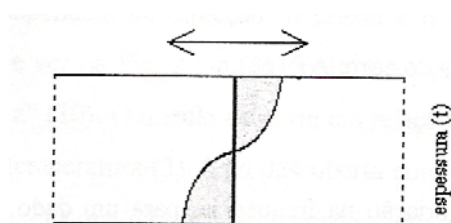


Figura 14- Movimento no modo de cisalhamento, com a dupla seta a indicar o deslocamento das partículas superficiais do cristal [24].

A frequência pode ser expressa por [26]:

$$F = \frac{V_{tr}}{2t} = \frac{N}{t} \quad [1]$$

onde V_{tr} é a velocidade de propagação de uma onda transversal ao plano do cristal, t é a espessura do cristal e N é a constante de frequência que é dada por $V_{tr}/2$.

A partir desta equação, Sauerbrey obteve uma expressão para a variação da frequência (ΔF), quando a espessura (t) da placa de quartzo é aumentada de uma quantidade diferencial (Δt) [26]:

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta t}{t} \quad [2]$$

substituindo uma forma diferencial da seguinte relação de massa e densidade:

$$t = -\frac{M}{A\rho_q} \quad [3]$$

onde M é a massa da placa de quartzo, A a superfície da placa e ρ_q a densidade do quartzo, na equação 4 tem-se:

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta M}{tA\rho_q} \quad [4]$$

onde ΔM_f é a massa do filme de qualquer substância que revista o cristal de quartzo.

Substituindo t por N/F , vem [26]:

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta M_f F}{A\rho_q N} \quad [5]$$

A constante de frequência (N) para um cristal AT é 0,1670MHz cm. Substituindo as outras constantes pelos seus valores ($\rho_q = 2,649 * 10^3 \text{ kgm}^{-3}$), obtém-se [26,32]:

$$\Delta F = -2,3 \times 10^6 F^2 \frac{\Delta M_f}{A} \quad [6]$$

onde ΔF é a variação de frequência devida ao revestimento (Hz), F é a frequência da placa de quartzo (MHz), ΔM_f a massa do revestimento depositado (g) e A a área revestida (cm^2).

Sauerbrey mostrou que a variação na frequência de ressonância do cristal era proporcional à massa depositada $\pm 2\%$ [31].

A equação 5 prevê que um cristal de 9 MHz terá uma sensibilidade de $400 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1}$ (eléctrodos de 3-8 mm de diâmetro), sendo o limite de detecção estimado cerca de 10^{-12}g [31].

A equação de Sauerbrey é utilizada para calcular a massa depositada nos eléctrodos do cristal, apesar de ser apenas uma boa aproximação para camadas finas e rígidas [26,32]. Pressupõe que a massa adicionada ou perdida à superfície do oscilador não experimenta qualquer deformação de cisalhamento durante a oscilação. Desta forma esta equação só é válida para razões de massa por unidade de área do filme e do quartzo não superiores a 0,02 [26,27,32].

Depois de Sauerbrey outros investigadores tentaram encontrar equações que pudessem ser usadas para camadas mais grossas que tivessem também em consideração as propriedades do filme depositado.

Behrnet mostrou que medindo o período da oscilação do cristal, em vez da frequência, permitia o aumento da massa por unidades de área do filme e do quartzo até cerca de 10 % [26].

Miller e Bolef [26,27], seguidos por Lu e Lewis trataram pela primeira vez, o filme e o cristal como estrutura ressonante composta, na qual o filme era parte integrante do sistema em vibração. Lu e Lewis chegaram à seguinte equação:

$$\tan\left(\frac{\pi F_c}{F_q}\right) = -\frac{\rho_f v_f}{\rho_q v_q} \tan\left(\frac{\pi F_c}{F_f}\right)$$

onde F_c é a frequência ressonante composta, F_q a frequência ressonante do quartzo, F_f a frequência ressonante do filme depositado, ρ_e e ρ_q a densidade do filme de quartzo e v_f e v_q as velocidades de onda de cisalhamento no filme e no quartzo. Esta equação mostra que a frequência depende da razão (z):

$$z = -\frac{\rho_f v_f}{\rho_q v_q}$$

entre as impedâncias acústicas no modo de cisalhamento do material depositado e do quartzo. A teoria mostra que a sensibilidade da massa da frequência de ressonância do cristal depende do material depositado e que a diferença aumenta rapidamente com o aumento da massa de carga [26,27,32].

A teoria “z-match” faz uso desta mesma equação e mostra que a sensibilidade varia com o material depositado e que a variação de substância para substância aumenta rapidamente com o aumento de massa. Estes sensores “z-match” são mais exactos que os anteriores, e de acordo com Benes, tem sido provado experimentalmente, funcionam com maiores sobrecargas de massa ($m_f/m_q = 0,7$). No entanto, ter-se-á que conhecer a densidade e o módulo de cisalhamento da camada ligada, o que na prática não é simples [33].

Benes [27] chegou a propor um método (“auto-z-match”) para estimar a razão z por medição das frequências de dois modos quasi-harmónicos, mas subsistiam alguns problemas teóricos e práticos que inviabilizavam, pelo menos até 1991, o uso de um instrumento comercial a utilizar esta técnica.

Mecea e Bucur desenvolveram uma teoria mais complexa, baseada no modelo de um ressonador composto, formado pelo cristal de quartzo e pelo filme depositado, chamado o modelo de transferência de energia. Ao contrário do modelo de Miller e Bolef, o filme não possui uma frequência de vibração própria. O quartzo será a parte activa e o filme vibrará sincronizadamente, graças à energia armazenada no quartzo. Este modelo prevê que o ressonador de quartzo é fortemente afectado pela viscosidade do filme depositado e pode

ser aplicado não apenas a sensores que operam em fase gasosa mas também para cristais imersos em líquidos [27].

Outras equações tem sido desenvolvidas e uma revisão nas principais teorias pode ser encontrada no trabalho de Thompson *et al.* Para além de todas as aproximações feitas nos diversos modelos teóricos, outros factores, tais como, o aspecto mecânico, o circuito eléctrico e temperatura, também afectam a exactidão absoluta [27].

Por todas estas razões é necessário usar as curvas de calibração no trabalho quantitativo.

Neste trabalho pretende-se verificar como varia a frequência com a massa no cristal, sendo esta a massa dos compostos voláteis resultantes da degradação da manteiga ao longo do tempo, tendo como gás de arraste o azoto.

A fim de podermos comparar as respostas do sensor ao longo do tempo na ausência de calibração é necessário trabalhar com um único cristal e manter todas as condições experimentais de caudal, posicionamento do cristal na célula ao longo de todo o período experimental.

5.2 Critérios para a escolha do revestimento

As aplicações analíticas do QCM (Quartz Cristal Microbalance) são baseadas na interacção entre o analito e os eléctrodos do cristal, resultando na diferença da frequência no cristal piezoeléctrico. Sempre que a interacção entre o analito e os eléctrodos do cristal não produzem uma medida da frequência, uma camada química disponível para interagir com o analito é aplicada sobre os eléctrodos [26,27,32].

A escolha do revestimento do cristal é um dos passos mais importantes no desenvolvimento do sensor. Desta escolha depende a estabilidade, reversibilidade, tempo de resposta, sensibilidade, reprodutibilidade e selectividade do mesmo. De salientar, que a estabilidade do revestimento depende da pressão de vapor do revestimento e da sua ligação ao cristal [24,26,32].

A interacção de um gás com um revestimento líquido ou sólido pode limitar-se à sua penetração através da interface. Um exemplo, é o revestimento constituído por fases cromatográficas estacionárias, que é bastante usado mas pouco selectivo, para além de os tempos de resposta serem muito longos [27].

Para além deste exemplo, existem outros onde o revestimento interage quimicamente com o gás. Esta interacção é geralmente fraca, designando-se por adsorção, que favorece a reversibilidade do sensor. No entanto, se o revestimento reagir com o gás, a energia envolvida é muito grande, a reversibilidade é menor e a selectividade maior [27].

A resposta do sensor depende da quantidade de revestimento, de um modo que terá necessariamente que estar ligado ao tipo de interacção com o analito. A variação da resposta, obtida para uma determinada concentração da espécie a detectar, com a quantidade de revestimento tem alguns erros, uma vez que os métodos de revestimento não são muito reprodutíveis.

A estabilidade do sensor a longo prazo, tem que ser testada, uma vez que alguns factores como: evaporação, oxidação ou saturação, podem levar à sua deteiorização.

5.3. Revestimento

5.3.1. Preparação do filme de decanoditiol

5.3.1.1 Limpeza do cristal de ouro

A limpeza do cristal de ouro é um passo fundamental e determinante para a posterior adsorção das soluções de alcanotióis.

Existem alguns procedimentos de pré-tratamentos de limpeza, nomeadamente os seguintes: enxaguamento com solventes, breve exposição à solução piranha e uma redução electroquímica de forma a dar à superfície um estado de limpeza reprodutível antes da adsorção do alcanotioliol [34].

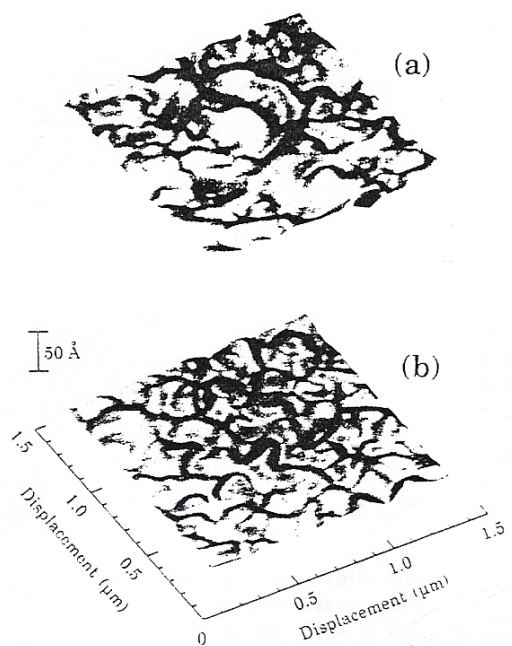


Figura 15- Imagens AFM do cristal Au/Si (a) limpo com o solvente e (b) limpo por uma breve imersão na solução piranha seguida de ciclo electroquímico entre os 0 e -0.8 V [34].

A figura 15 (a) mostra uma imagem AFM (Atomic Force Microscopy) de um cristal limpo de Au/Si. Depois da caracterização AFM, o eléctrodo usado na figura 8 foi exposto durante 10-15 s a $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ quente, de forma a remover alguma material orgânico adsorvido. As imagens AFM não mostram diferenças entre o eléctrodo, depois de mergulhado na solução piranha e o eléctrodo enxaguado com solvente, etanol. A raiz quadrada da média do quadrado da rugosidade da superfície tratada é 3.4 nm. Depois da caracterização por AFM, o mesmo eléctrodo é sujeito a alguns ciclos de varrimento de potenciais electroquímicos, figura 16, entre os 0 e -0.8 V em 1.0 NaCl, enxaguado em água pura e seco num fluxo de ar.

A imagem AFM da superfície resultante, figura 15 (b) mostra um alisamento topográfico e um decréscimo na raiz quadrada da média do quadrado da rugosidade para 2.7 nm. Este pequeno efeito de alisamento foi de forma reprodutível observado em tratamentos semelhantes de substratos de Au/Si.

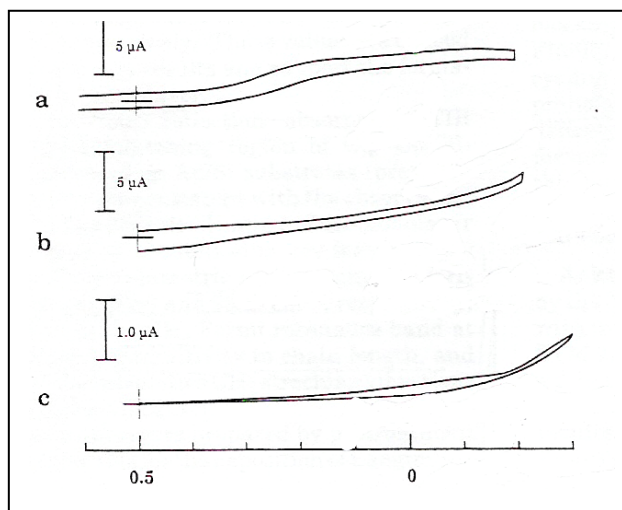


Figura 16- Resposta de voltametria cíclica de 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ em 1 M de NaCl das camadas auto-montadas de hexadecanotiol no cristal de Au/Si depois de (a) enxaguado com solvente, (b) breve imersão em H_2O_2/H_2SO_4 quente 1:3 e (c) tratamento com solução piranha seguida de voltametria cíclica entre os 0 e -0.8 V [34].

5.3.1.2. Revestimento do cristal

A figura 17 ilustra, de modo muito simplificado, o procedimento utilizado na preparação das monocamadas auto-montadas, usualmente designadas por SAMs (*Self-Assembled Monolayers*), recorrendo ao sistema Au-Alquiltiol [35].

A qualidade da monocamada resultante, em termos de cobertura da superfície, organização e estabilidade, está relacionada com a morfologia e limpeza do substrato, com as condições da deposição, concentração da solução, tempo de deposição e natureza do solvente [36,37,38,39].

As soluções de alcanotióis têm concentrações milimolares (1-50 mM) e são preparadas em etanol absoluto pouco tempo antes de cada experiência. Os eléctrodos de ouro são mergulhados numa solução de tiol. Devido à forte interacção entre o ouro e o tiol, a adsorção da monocamada no substrato processa-se em alguns segundos. No entanto, são necessários tempos de adsorção de pelo menos 15 horas, para se obter uma monocamada estável e organizada [35]. No esquema ilustrativo da figura 17, a fase de “Adsorção” corresponde à formação de uma monocamada incompleta e desorganizada, enquanto que a fase “Organização” ilustra o estado de equilíbrio de adsorção de uma monocamada densa e organizada. Depois da adsorção, os substratos revestidos com os alcanotióis são removidos do tiol, enxaguados abundantemente com etanol e água e secos com ar altamente puro [35].

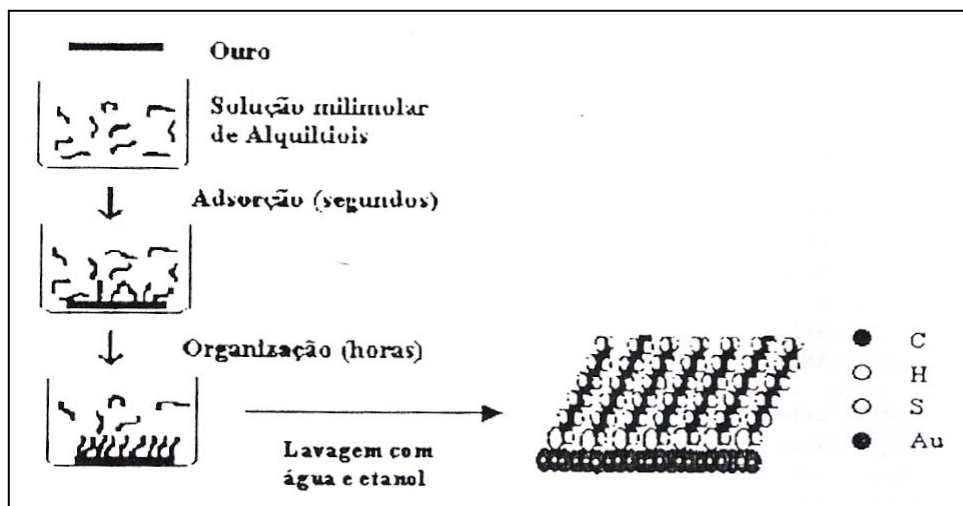


Figura 17- Esquema ilustrativo do procedimento utilizado na preparação das monocamadas auto-montadas.

A adsorção de alcanotióis C_{10} - C_{18} durante 24h no cristal de Au/Si, anteriormente imerso (10-15s) na solução piranha, torna as monocamadas formadas mais bloqueantes do que aquelas obtidas lavando o cristal só com o solvente [34].

Para além do mais, o melhoramento do bloqueio das camadas é mais notável nas cadeias carbonadas mais longas. Quanto maior é a cadeia de hidrocarbonetos mais elevado é o carácter hidrofóbico, mais fortes são as interações entre os grupos da cauda e maior é a quantidade de espécies adsorvidas [35].

A elevada organização da monocamada formada é conseguida pela afinidade existente entre um grupo (cabeça) e o substrato que estabelecem entre si uma ligação química reforçada com a interacção favorável entre os grupos da cauda [40,41].

No caso das SAMs nos alcanotióis, esta ligação deve-se à afinidade do enxofre relativamente ao ouro, e à interacção lateral forte (4 a 8 kJ por CH_2) devido às forças de Van der Waals entre as cadeias, tal como ilustra a figura 18 [34].

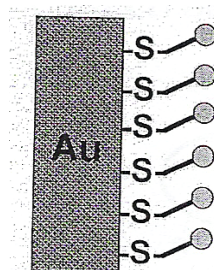


Figura 18- Esquema ilustrativo de um tio-composto numa monocamada auto-montada [34].

6. Cromatografia gasosa com Espectrómetro de Massa

6.1. Instrumento

A cromatografia é a separação de uma mistura de compostos (solutos) em diferentes componentes. Através da separação da amostra em componentes individuais, torna-se mais fácil identificar (qualitativamente) e medir a quantidade dos vários componentes da amostra.

Existem diversas técnicas cromatográficas sendo a cromatografia gasosa (GC) uma das técnicas mais utilizadas. Estima-se que cerca de 10-20% de compostos conhecidos podem ser analisados por GC. Para uma boa análise de GC, o composto deve ter volatilidade suficiente e estabilidade térmica [42].

A amostra é introduzida no injector geralmente com uma seringa ou fibra. O injector está geralmente à temperatura de 150-250°C o que leva a amostra a evaporar. A amostra vaporizada é arrastada por um fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel (FM) ou gás de arraste, tal como se ilustra na figura 19. A coluna é mantida a uma temperatura controlada pelo forno. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária (FE) (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura. Os solutos percorrem a coluna com diferentes velocidades e a partir do momento que cada soluto elui a partir da coluna, entra num detector, dispositivo que gera um sinal eléctrico proporcional à quantidade de material eluído. O registo deste sinal em função do tempo denomina-se cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa [42,43].

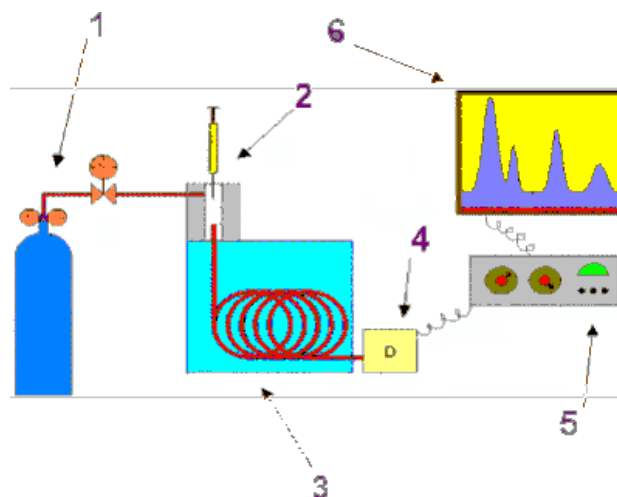


Figura 19 - Esquema ilustrativo de um cromatógrafo a gás [42].

Legenda:

- 1 - Reservatório de Gás e Controles de Vazão / Pressão
- 2 - Injetor (Vaporizador) de Amostra
- 3 - Coluna Cromatográfica e Forno da Coluna
- 4 - Detector
- 5 - Amplificador do sinal
- 6 - Aquisição e armazenamento dos resultados cromatográficos

Os constituintes básicos de um sistema cromatográfico são [42,43]:

- *Reservatório de Gás de Arraste*: o gás de arraste fica contido em cilindros sob pressão. O gás de arraste utilizado terá ser compatível com o detector. Os gases mais utilizados são H_2 , He e N_2 e a caudal do gás de arraste, que deve ser controlado, é constante durante a análise.

- *Sistema de Introdução de Amostra*: na CG, a amostra é introduzida no injetor (ou vaporizador). Na versão mais simples, trata-se de um bloco de metal ligado à coluna cromatográfica e à alimentação de gás de arraste. Este bloco contém um orifício com um septo, geralmente de borracha de silicone, pelo qual amostras líquidas ou gasosas podem ser injectadas com microseringas hipodérmicas.

No caso de se utilizarem fibras de adsorção o injector terá que ser modificado, sendo introduzido uma “guia” (liner) para evitar partir a fibra.

As amostras sólidas podem ser dissolvidas num solvente adequado.

O injector deve estar aquecido a uma temperatura acima do ponto de ebulição dos componentes da amostra, para que a amostra se volatilize completa e instantaneamente e seja carregada para a coluna. Se a temperatura for excessivamente alta, pode ocorrer decomposição da amostra. A amostra deve entrar na coluna na forma de um segmento estreito, para evitar alargamento dos picos [43].

A quantidade de amostra injectada depende da coluna e do detector utilizado. Para colunas empacotadas, volumes de 0,1 µl a 3,0 µl de amostra líquida são típicos. Volumes maiores prejudicam a qualidade da injeção (alargamento dos picos) ou saturam a coluna cromatográfica. Para a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), os volumes de injeção deveriam ser da ordem dos nanolitros. Não existe, contudo, um meio simples de medir um volume tão pequeno com a precisão necessária e por isso, os injectores para CGAR estão dotados de "divisores de amostra", de modo que apenas uma fracção do volume injectado (tipicamente entre 1/10 e 1/300) chega à coluna, sendo o restante descartado [42].

- *Coluna Cromatográfica e Controlo de Temperatura da Coluna:* após a injeção e a vaporização da amostra, esta chega à coluna cromatográfica, onde é feita a separação. Na CG a "afinidade" de um soluto pela FM é determinada pela volatilidade do soluto, e pressão de vapor, que são determinadas pela estrutura do composto e pela temperatura. Alterando-se a temperatura, altera-se também a pressão de vapor e, por conseguinte, a "afinidade" de uma substância pela FM.

Se a temperatura da coluna for excessivamente baixa, todos os constituintes da amostra terão pressões de vapor muito baixas e ficarão quase todo o tempo dissolvidos na FE, fazendo com que a sua migração pela coluna seja muito lenta. O resultado pode ser um tempo excessivo de análise e picos muito largos e baixos (quanto mais tempo a substância passa na coluna, mais ela se espalha) podendo eventualmente, o composto nem chegar a sair da coluna [42]. Por outro lado, uma temperatura muito alta implica pressões de vapor

também muito grandes e os compostos quase não passam tempo nenhum dissolvidos na FE, saindo muito rapidamente da coluna sem serem separados. Assim, a temperatura da coluna é um parâmetro que deve ser ajustado para se obter uma separação adequada.

Para além de assegurar a separação, a temperatura escolhida deve ser compatível com a FE em causa, pois as FE líquidas volatilizam-se ou degradam-se com temperaturas excessivas [43].

A temperatura da coluna deve ser rigorosamente controlada, para assegurar a reprodutibilidade das análises.

No caso de amostras contendo constituintes com pressões de vapor muito diferentes, se a temperatura for ajustada para separação adequada dos compostos menos voláteis (temperaturas altas), os voláteis serão muito pouco retidos e não serão separados. Por outro lado, se o acerto for feito para separar os voláteis (temperaturas baixas), os constituintes pesados apresentar-se-ão sob a forma de picos excessivamente largos e baixos ou ficarão retidos na coluna. Este problema pode ser contornado usando a programação linear de temperatura (PLT), através da qual a temperatura da coluna vai sendo aumentada gradualmente durante a análise. A PLT permite separações de amostras muito complexas (petróleo, óleos essenciais, etc.), não analisáveis com temperatura de coluna constante (CG Isotérmica) [43].

- *Detector*: o último bloco de um CG é o detector, é um dispositivo que indica e quantifica os compostos separados pela mistura.

6.2 O Espectrómetro de Massa

Os dois detectores mais significativos em CG são o Detector por Condutividade Térmica (DCT) e o Detector por Ionização em Chama (DIC) [43].

Para além destes existe o espectrómetro de massa (MS) que, devido à sua elevada sensibilidade e capacidade de resolução, era muito dispendioso há algum tempo atrás. No

entanto, nos dias de hoje o seu uso é mais vulgar pois já não é tão dispendioso, sendo muito útil a sua utilização.

Um espectrómetro de massa, tal como ilustra a figura 20, é constituído por três unidades básicas: a fonte, que tem como objectivo a ionização, isto é, a formação de iões da amostra que se pretende analisar; o analisador, o qual tem como objectivo a separação dos iões de acordo com a sua razão m/z ; e o detector, que tem como função a produção de um sinal eléctrico que é proporcional à abundância dos iões de uma dada razão m/z [43,44,45].

O primeiro passo para a obtenção de um espectro de massa é a produção de iões a partir da amostra a analisar, que pode ser feita por Impacto Electrónico (IE).

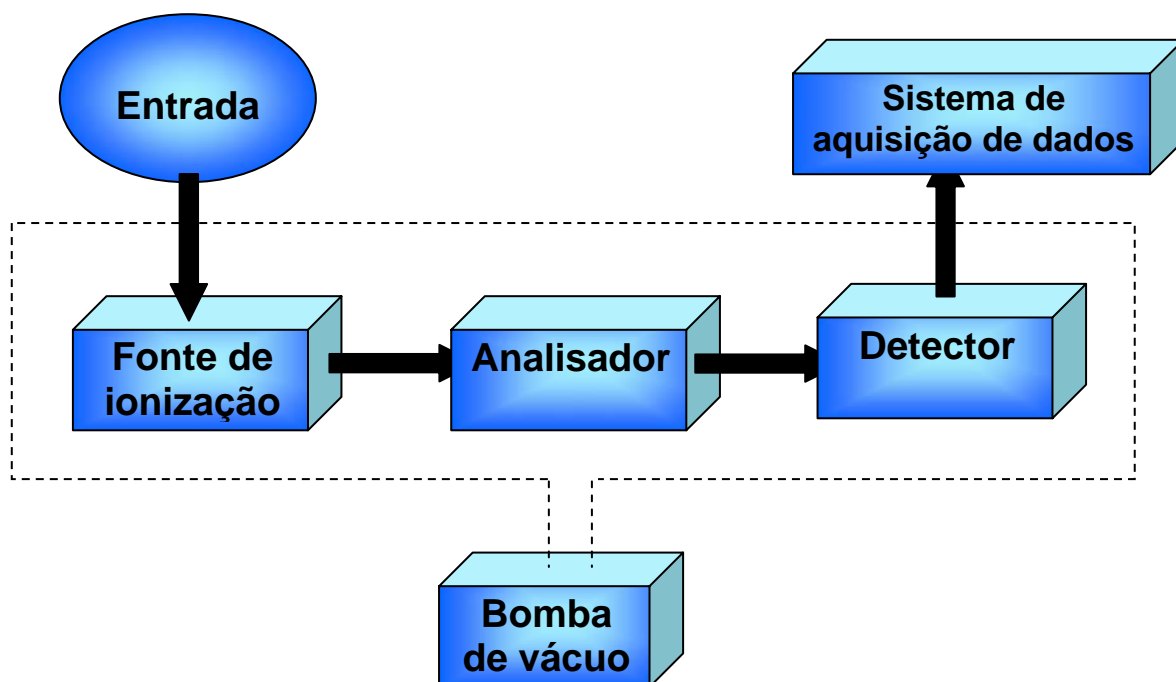


Figura 20- Esquema ilustrativo de um Espectrómetro de Massa (adaptado da referência [46]).

6.2.1 Fonte de Ionização

Na figura 21 apresenta-se de forma esquemática uma fonte de ionização de um espectrómetro de massa. A ionização por impacto electrónico da amostra é conseguida não pela colisão dos electrões com as moléculas da amostra mas sim pela interacção dos

electrões ionizantes com a nuvem electrónica das moléculas do composto a analisar [44,45].



Os electrões são produzidos por um filamento de tungsténio, que se encontra a uma temperatura de 2000 °C, sendo os electrões acelerados na direcção da câmara de ionização. Os electrões ao atravessarem a câmara de ionização são acelerados em direcção a um eléctrodo, o colector, que se encontra a um potencial superior ao da câmara de ionização [43].

A existência de um campo magnético, resultante da presença de um magnete permanente faz com que seja produzido um feixe de electrões estreito, forçando os electrões a atravessarem a câmara de ionização. Existe ainda um outro eléctrodo, o repelidor, que tem como função repelir os iões formados, para o exterior da câmara de ionização. O repelidor encontra-se a um potencial de 4 kV e portanto os iões positivos são repelidos para o exterior da câmara com uma $E_c \approx 70$ eV [44,45,46].

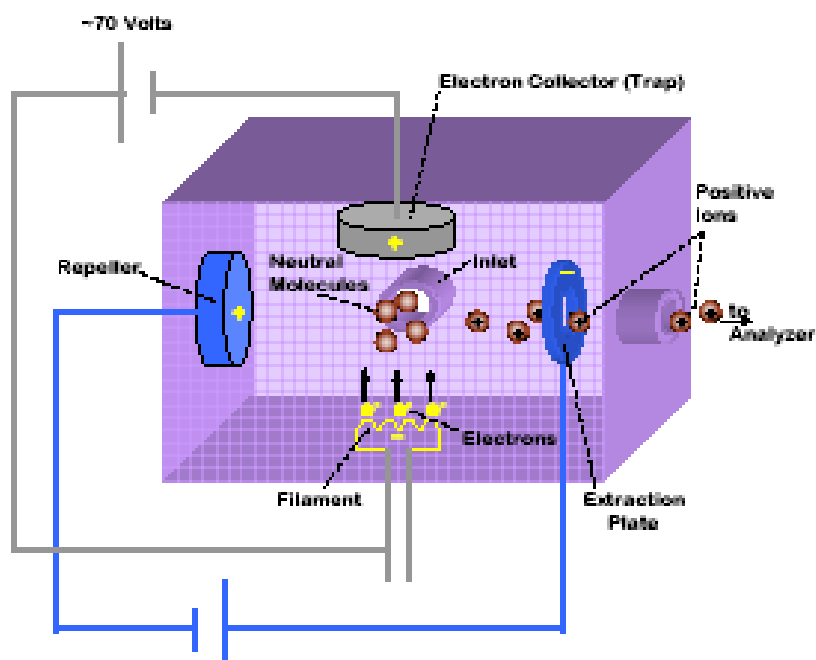


Figura 21 - Esquema ilustrativo da fonte de ionização de um espectrómetro de massa [46].

6.2.2 Analisador Quadrupolar

Num analisador como o quadrupolo, quatro barras cilíndricas são colocadas de forma equidistante em relação a um eixo central (imaginário), como se pode verificar na figura 22.

Potenciais eléctricos estáticos e alternos, são aplicados em barras cilíndricas opostas de forma a surgir um campo eléctrico flutuante. Os iões positivos e negativos (espécies carregadas electricamente) da fonte são injectados ao longo do eixo central do quadrupolo [44,45].

Para dadas frequências e intensidades do campo eléctrico apenas os iões de dada massa podem passar de forma a chegarem ao detector. Os iões com massas muito grandes e muito pequenas para passarem através do quadrupolo chocam com as barras cilíndricas e perdem-se.

Alterando o campo eléctrico de uma forma consistente, a massa de todos os iões formados na fonte podem ser varridos sequencialmente de massas baixas para massas altas, ou vice-versa, para formar um espectro de massa [44,45].

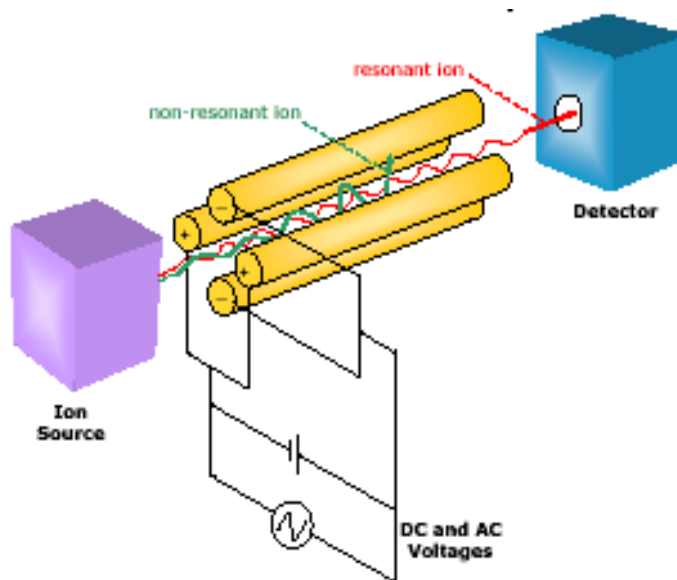


Figura 22- Esquema ilustrativo de um analisador quadrupolar [46].

6.2.3 Aquisição e Tratamento de Dados

Os modos de aquisição podem ser diferentes, conforme o objectivo em causa. Pode-se trabalhar em modo de varrimento (SCAN), seleccionando um ião determinado (SIM - Selected Ion Monitoring) e MS/MS [45].

Em modo de varrimento o espectro obtido em cada varrimento é único. Cada pico do cromatograma é o somatório de todos os iões do espectro de massa, a esse tempo de retenção.

A identificação dos compostos voláteis é feita inicialmente por comparação com os compostos presentes nas bases de dados (livrarias informatizadas), sendo as mais gerais a NIST (com cerca de 80 000 espectros) e WILEY (com cerca de 250 000 espectros) ou com outras compilações de espectros como a Eighth Peak Index of Mass Spectra, e confirmada através da comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massa com os dos compostos puros.

O CG/MS é uma técnica eminentemente quantitativa. O princípio básico da quantificação é que a área dos picos registadas no cromatograma é proporcional à massa do composto injectado. Assim, é fundamental para que a análise possa ser fíável que a área dos picos seja medida o mais exacto e reprodutivelmente possível. Existem vários modos de se medir a área de um pico cromatográfico: as técnicas manuais, que presentemente estão em desuso, e os integradores electrónicos que são dispositivos baseados em microprocessadores que colectam o sinal cromatográfico, digitalizam-no, detectam a presença de picos e calculam a sua área. Os integradores são muito mais precisos e rápidos que qualquer método manual de medida, desde que utilizados convenientemente [44,46].

Qualquer que seja o modo usado para medir a área dos picos, o procedimento geral de uma análise quantitativa por CG envolve a obtenção do cromatograma da amostra, a medida da área dos picos de interesse e o cálculo da massa correspondente a cada um dos picos. Como é muito difícil conseguir boa reprodutibilidade entre injeções diferentes, em trabalhos que exijam rigor é necessário injectar um padrão interno.

No presente trabalho só estamos interessados em ver alterações significativas na variação da quantidade. Excedendo esta a variabilidade do método de injeção, não foi necessário a injeção de um padrão interno.

7. Micro-Extracção em fase sólida (SPME)

Tendo em conta o objectivo deste trabalho experimental, pensa-se que a técnica de extracção ideal seja a micro-extracção em fase sólida, usualmente designada por SPME (*Solid Phase Micro-Extraction*), visto que os compostos a analisar são extremamente voláteis (encontrando-se na fase gasosa) e porque a natureza da amostra impede que a mesma seja introduzida directamente no cromatógrafo.

A técnica de extracção chamada micro-extracção em fase sólida (SPME) foi desenvolvida por Pawliszyn e seus colaboradores. Esta técnica é um método de pré-concentração de amostras que elimina muito do tempo e custo associados à análise de compostos orgânicos [47,48].

7.1 Fibras utilizadas

A SPME utiliza fibras de sílica fundida, revestidas com um fino filme de um polímero ou de um sólido adsorvente, que servem para extrair compostos da fase aquosa ou gasosa [47].

Neste trabalho vai-se usar uma fibra com o revestimento de 75 µm Carboxen / Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) Supelco, parcialmente reticulada.

Esta fibra é estável em muitos solventes miscíveis em água, e em alguns solventes não polares. [49] Tem especial aplicação em gases ou compostos de baixo peso molecular (massa molecular inferior a 90). Quando a massa molecular é superior a 150 os analitos não são bem extraídos por este tipo de fibra. [50]

Qualquer fibra antes de ser usada, deve ser condicionada. A temperatura e o tempo de condicionamento dependem do tipo de fibra em causa, podendo esta fibra suportar temperaturas até 320°C.

Estas fibras são frágeis, razão pela qual são retraídas para dentro do tubo hipodérmico aquando da sua introdução no porta-amostras ou no cromatógrafo.

Para além disso, existem outras recomendações para o uso destas fibras [36]:

- não dobrar a agulha que contém a fibra, pois produziria atrito entre as paredes da agulha;
- verificar que não ficam restos de septo ou de outras partículas no orifício da agulha que possam ocasionar uma obstrução da mesma;
- nunca secar a fibra com papel ou outro material que possa destruir a fibra;
- evitar que a seringa se incline enquanto permanecer colocada no forno.

7.2 Técnica de Micro-extracção em fase sólida

7.2.1 Introdução

Nesta técnica, a fibra é colocada em contacto com a amostra durante um intervalo de tempo bem definido. Se o intervalo de tempo for suficiente, atinge-se o equilíbrio de concentração entre a amostra e a fase extractora. Depois do equilíbrio ser atingido, expor a fibra por mais tempo não vai fazer com que se acumulem maiores quantidades de analito.

A técnica de SPME é um processo de equilíbrio entre fases. Frequentemente o sistema de extracção é complexo, como por exemplo no caso em que a amostra consiste numa fase aquosa que tem partículas sólidas suspensas, havendo várias interacções de adsorção com os analitos, para além de um espaço de cabeça gasoso. Em alguns casos, há ainda factores específicos que têm de ser considerados, tais como as perdas de analito por biodegradação ou por adsorção nas paredes do frasco [47,48,51].

Geralmente, a extracção por SPME é considerada completa quando a concentração do analito atingiu o equilíbrio na sua distribuição entre a matriz da amostra e o revestimento da fibra. Na prática, isto significa que uma vez atingido o equilíbrio, a

quantidade extraída é constante dentro dos limites do erro experimental e é independente de aumento no tempo de extracção [47,48,51]. As condições de equilíbrio podem ser descritas pela equação 7:

$$n = \frac{(K_{fs} V_f V_s C_0)}{(K_{fs} V_f + V_s)} \quad (7)$$

em que n é a massa de analito extraída pela fibra, K_{fs} é a constante da distribuição da amostra matriz com o revestimento da fibra, V_f é o volume do revestimento da fibra, V_s é o volume da amostra e C_0 é a concentração inicial do analito na amostra. Esta equação indica que existe uma proporcionalidade directa entre a concentração da amostra e a quantidade de analito extraído. Esta é a base da quantificação do analito [48,51].

A equação anterior que assume que a matriz da amostra pode ser representada como uma única fase homogénea e que não existe espaço de cabeça presente no sistema, pode ser modificada de forma a ter em conta a existência de outros componentes na matriz considerando o volume das fases individuais e as constantes de distribuição apropriadas [48].

Para obter reprodutibilidade é necessário manter constantes as condições de convecção e o tempo de extracção. Uma das maiores vantagens de SPME é poderem ser utilizadas fibras revestidas para extrair analitos de amostras extremamente pequenas [48].

Deve-se ter em conta que a fracção de analito extraída aumenta à medida que o volume de revestimento da fibra aumenta. A extracção completa pode ser conseguida para pequenos volumes de amostra quando as constantes de distribuição são relativamente altas [48].

Quando o volume da amostra é extremamente grande ($K_{fs} V_f \ll V_s$) a equação anterior pode ser simplificada:

$$n = K_{fs} V_f V_s C_0$$

Ai *et al* [51] desenvolveu um modelo de SPME dinâmico que mostra que até mesmo em condições de não equilíbrio a proporcionalidade entre o analito adsorvido e a concentração inicial da amostra existe. Isto permite verificar que a análise quantitativa de SPME é possível em situações de não equilíbrio se o tempo de adsorção for constante [51].

Esta técnica, apresenta importantes vantagens [49]:

- Velocidade: geralmente o equilíbrio é conseguido em 2 a 30 minutos;
- Sensibilidade: foram já conseguidos limites de detecção da ordem das partes por trilião;
- Economia: as fibras são reutilizáveis, o seu tempo de vida depende das condições de uso, tendo-se já conseguido mais de 100 utilizações;
- Evita pré-tratamento da amostra, uma vez que a fibra pode ser exposta a amostras com matrizes muito complexas;
- Versatilidade: pode ser usada com diferentes equipamentos;
- Não requer instrumentação analítica sofisticada;
- Não utiliza solventes orgânicos [36].

A extracção pela técnica de SPME pode ser feita de três formas: extracção directa, extracção no espaço de cabeça e extracção com membrana protectora [47,48].

A técnica de SPME é uma técnica que combina extracção, concentração da amostra e introdução da mesma.

Existem alguns factores que têm que ser cuidadosamente controlados durante a extracção, como a temperatura, a agitação e o volume da amostra [47,48,51].

- O efeito da temperatura é muito importante nesta técnica pois pode afectar bastante os resultados. O aumento da temperatura promove no sistema uma maior energia cinética, aumentando o transporte de massa de forma a aumentar a resposta. Contudo se o sistema está em equilíbrio, temperaturas elevadas não darão respostas elevadas a não ser que processo seja exotérmico, já se o sistema não estiver em equilíbrio, temperaturas elevadas darão respostas elevadas.

- O efeito da agitação é muito importante nesta técnica, pois tem importantes repercussões na cinética. A difusão do analito através do solvente é geralmente o passo que controla a velocidade do processo de adsorção. Aumentar a velocidade de agitação faz com que o equilíbrio se atinja mais rapidamente e que a resposta obtida, num dado intervalo de tempo, seja maior [47,48,51].
- O efeito do volume da amostra é um importante parâmetro que afecta os resultados quantitativos, e ao contrário do que se pensa, só é desprezível em pouquíssimos casos [47,48,51].

Se o coeficiente de partição, K , é conhecido, o efeito do volume da amostra na partição do analito entre a amostra e o polímero da fibra no equilíbrio pode ser previsto usando a seguinte equação:

$$K = \frac{C_f}{C_s} = \frac{(n/V_f)}{C_0 - (n/V_s)} \quad (7)$$

onde C_f é a concentração do analito no filme do polímero SPME, C_s a concentração do analito na amostra matriz, n a quantidade de analito adsorvido pelo filme do polímero SPME, V_f é o volume do filme do polímero SPME, C_0 é a concentração inicial do analito da amostra matriz antes da amostragem SPME e V_s é o volume da amostra matriz. Resolvendo esta equação em função de n , tem-se a equação 8:

$$n = \frac{KV_f V_s}{V_s + KV_f} C_0 \quad (8)$$

Esta equação dá a relação entre a quantidade de analito adsorvido pela fibra e o volume da amostra. [51] Desta forma quanto maior for o volume da amostra, maior será a resposta.

Depois da extracção a fibra é inserida directamente numa porta de injeção aquecida (geralmente de um cromatógrafo (GC)), e os compostos químicos adsorvidos pelo polímero são termicamente desadsorvidos e posteriormente analisados.

7.2.2 Extracção no espaço de cabeça

No método do espaço de cabeça, o analito é extraído da fase gasosa que está em equilíbrio com a amostra [48]. Na figura 23 mostra-se em esquema a adsorção em espaço de cabeça. A primeira razão para a análise por este método é proteger a fibra de efeitos nocivos causados por substâncias não voláteis, com elevado peso molecular que estão presentes na amostra e esta é a principal razão que nos levou a utilizá-lo neste trabalho. O método de espaço de cabeça também permite modificações na amostra (por exemplo ajuste de pH) sem afectar a fibra. Verifica-se também que os analitos voláteis e não polares são extraídos mais rapidamente que os semi-voláteis ou polares voláteis [47,48,51].

A temperatura tem um efeito significativo na cinética do processo, porque determina a pressão de vapor dos analitos acima da fase condensada.

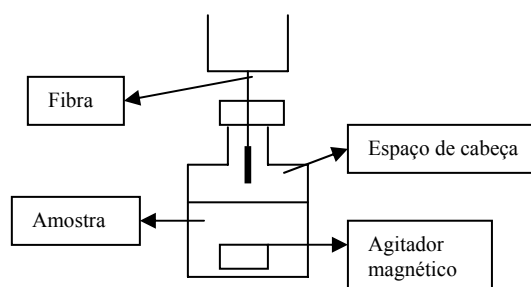


Figura 23- Método de extração no espaço de cabeça.

Já o volume de espaço de cabeça não influencia os resultados nem o tempo amostragem é importante [51], desde que o equilíbrio seja atingido, entre o analito e a fase gasosa, o que pode levar horas ou dias.

8. Parte Experimental

8.1. Reagentes

Todos os reagentes usados eram *p.a.* e foram utilizados sem purificação prévia. O gás de arraste utilizado no Sensor era proveniente do ArLíquido, Azoto (Alphagaz). O gás de arraste utilizado na cromatografia gasosa era o hélio, ArLíquido, (Alphagaz).

Para a limpeza do cristal utilizou-se a solução piranha, H₂O₂/H₂SO₄ e para o revestimento do cristal utilizou-se o decanoditiol, KCl e etanol (Merck n.º 1.11727.2500).

Os reagentes utilizados nas experiências foram: ácido butanóico (Fluka n.º 19210), 2-heptanona (Fluka n.º 68592), 1-hexanol (Fluka n.º 73117), 2-nonanona (Aldrich 10.873-1), 2-pentanona (Fluka n.º 68950), 2-undecanona (Fluka n.º 68160), 2-propanona (Merck n.º 1.00014.2511), ácido acético (Panreac n.º 131008) e metanol (Fluka n.º 65543), ácido propanóico (Merck 800605), 3-hidroxi-2-butanona (Merck 820664), ácido pentanóico (Merck 800821), ácido hexanóico (Aldrich 15.374-5) e 2-butanona (José M. Vaz Pereira, LTD. Rua Madalena, 133-1.º - Lisboa).

Neste trabalho utilizou-se manteiga fresca, sempre da mesma marca “Manteiga Coimbra” (Milagaia - Soc. T. Prod. Lácteos, Lda. Horta dos Bacelos, Lote 6-A, Santa Iria de Azóia) em embalagens de 1 kg.

8.2. Fibra utilizada

A fibra utilizada neste trabalho foi uma fibra com o revestimento de 75 µm Carboxen / Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) Supelco, parcialmente reticulada.

8.3. Montagem e Procedimento Experimental para a adsorção dos compostos de espaço de cabeça por SPME

Neste trabalho pretendeu-se seguir ao longo do tempo a degradação da manteiga. Para tal foi necessário utilizar a técnica SPME.

A fibra foi sempre condicionada antes de ser usada. A temperatura de condicionamento foi de 280°C durante 30 minutos. Se estivesse mais tempo, não danificava. A temperatura máxima que a fibra podia aguentar era de 320°C.

Estas fibras são frágeis, razão pela qual foram sempre retraídas para dentro do tubo hipodérmico aquando da sua introdução no porta-amostras.

Para além disso, teve-se especial atenção para alguns aspectos importantes no uso destas fibras:

- não dobrar a agulha que contém a fibra, pois produziria atrito entre as paredes da agulha;
- verificar que não ficam restos de septo ou de outras partículas no orifício da agulha que possam ocasionar uma obstrução da mesma;
- nunca secar a fibra com papel ou outro material que possa destruir a fibra;
- evitar que a seringa se incline enquanto permanecer colocada no forno.

Na análise da manteiga efectuou-se o seguinte procedimento: a manteiga, comprada de fresco, foi dividida por frascos de 100 mL, colocando-se em cada um 30 g de manteiga.

Os frascos foram fechados por meio de um septo de silicone e de uma cápsula de alumínio.

De seguida estes frascos foram colocados numa estufa que se encontrava à temperatura de 45° C, registando-se as horas a que se colocavam.

Uma amostra foi analisada de imediato e as restantes em dias previamente definidos e espaçados. A tempos definidos, foi retirado um frasco da estufa registando-se a hora de saída e foi colocado imediatamente num banho termostatizado a 45°C.

Após o frasco estar seguro, tal como ilustra a figura 24, esperaram-se 10 minutos para atingir o equilíbrio térmico e introduziu-se a fibra no frasco, atravessando o septo, já perfurado. Ligou-se o agitador a uma velocidade constante (30 r.p.m.) e iniciou-se a adsorção, que tinha a duração de 1 hora (figura 25).

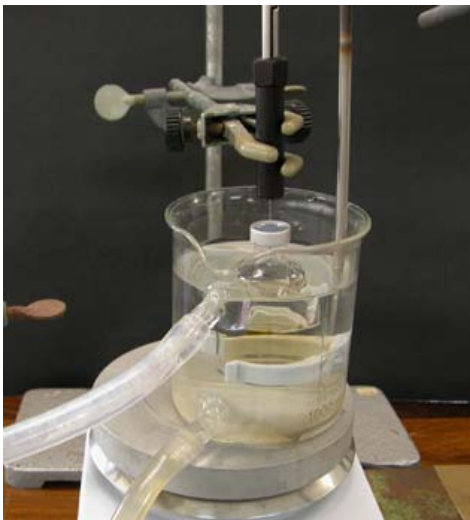


Figura 24- Frasco de manteiga inserido no banho-maria



Figura 25 - Método de espaço de cabeça para a amostra de manteiga, à temperatura de 45°C.

A análise dos compostos adsorvidos nas fibras foi feita utilizando o sensor de massa e um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrómetro de massa (GC/MS).

8.4. Cromatografia gasosa – espectrometria de massa

8.4.1 Instrumento

A análise dos compostos adsorvidos na manteiga foi realizada por meio de um cromatógrafo a gás 6890N Network GC System (Agilent Technologies), acoplado a um espectrômetro de massa do tipo quadrupolo 5973 Network (Agilent Technologies). O instrumento pode-se observar na figura 26.

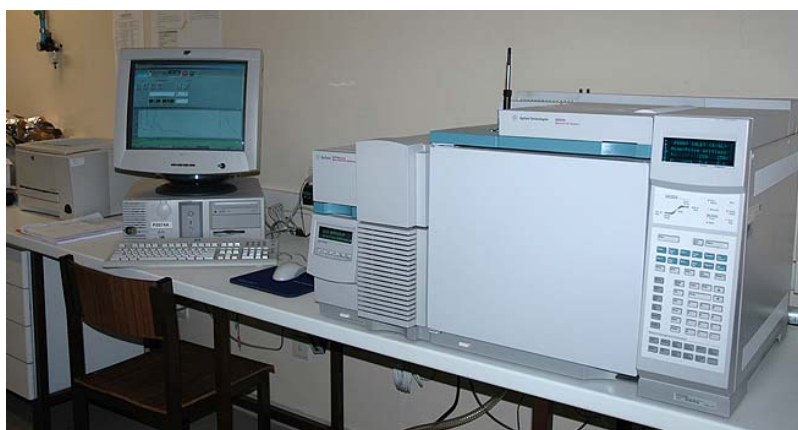


Figura 26- Cromatógrafo de gás/espectrômetro de massa.

Um injetor do tipo splitless, que se encontrava à temperatura de 250 °C, foi utilizado para introduzir a fibra no CG. Os compostos desorvidos foram arrastados pelo gás de arraste, hélio, à velocidade 1,7mL/min. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida, DBFFAP, com 30 m x 0,25mm (d.i). A interface do CG com o detector espectrômetro de massa foi mantida a 280°C. O espectrômetro de massa operou no modo EI (impacto electrónico) com uma energia de ionização de 70 eV, com um varrimento entre 30-300 m/z, a 1 ciclo/s. Os dados gerados foram controlados e armazenados num computador.

8.4.2 Metodologia Experimental

Após os 60 minutos no espaço de cabeça do frasco com a amostra de manteiga, a fibra deveria ser introduzida no cromatógrafo.

Uma vez que o instrumento GC/MS se encontrava fisicamente muito distante do local onde se fez adsorção dos compostos, e como tal poderia adsorver impurezas da

atmosfera presente nos corredores ou laboratórios, foi necessário levar a fibra dentro do frasco da manteiga desde o local de adsorção até a introdução da fibra no injetor do cromatógrafo, com o tempo da transferência entre os dois locais sempre controlado e igual para todas as amostras da manteiga.

A fibra foi introduzida no injetor, a 250 °C, tal como ilustra a figura 27, durante 15 minutos, sendo desorvidos os compostos da fibra, que foram arrastados por um gás inerte (hélio) ao longo da coluna até ao detector, a partir do qual se obteve a resposta.



Figura 27- Introdução da fibra no GC/MS.

O programa de temperatura específico para o trabalho em questão, apresenta-se na figura 28.

T (injetor) = 250 °C

T (detector) = 250 °C

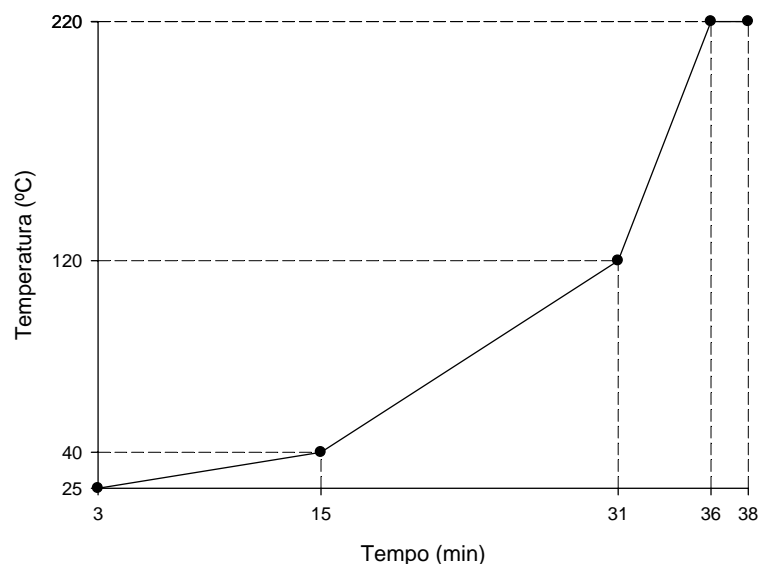


Figura 28- Programa de temperaturas utilizado no GC/MS.

Os dados obtidos foram armazenados e guardados num computador, podendo os cromatogramas e os espectros de massa ser impressos posteriormente.

Todas as análises foram precedidas de um branco.

Após os 15 minutos de desorção, a fibra foi retirada e colocada num frasco fechado, limpo e seco, onde foi trazida novamente para o local de adsorção, para se fazer o mesmo procedimento com outra amostra de manteiga.

A fim de identificar os picos do cromatograma foram injectados padrões de diversos compostos puros, tendo sido a identificação feita por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa.

A sensibilidade do sistema fibra/GC/MS para os diversos compostos foi avaliada registando a área dos picos cromatográficos que se obtiveram quando se introduziu a fibra, que tinha estado anteriormente em contacto com uma solução, preparada em metanol com quantidades conhecidas dos diversos padrões. As áreas de cada um dos compostos foram registadas para quatro soluções com diferentes concentrações.

Os passos de desorção e a análise foram em tudo semelhantes aos utilizados para as amostras de manteiga.

8.5. Sensor de Massa

8.5.1 Instrumentação

Nesta parte do trabalho, foi utilizado um sensor de massa, uma microbalança de cristais piezoelétricos. A instrumentação pode-se observar na fig.29.

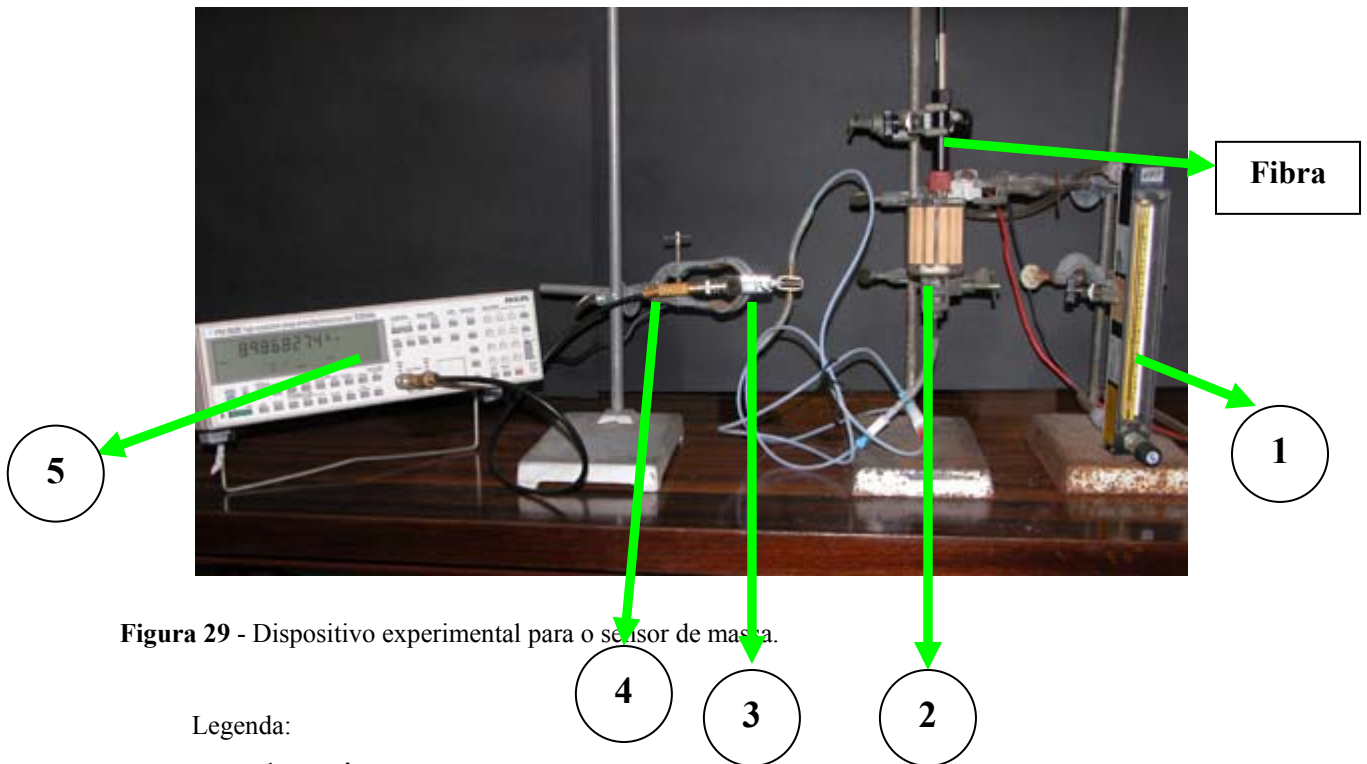


Figura 29 - Dispositivo experimental para o sensor de massa.

Legenda:

- 1- rotâmetro
- 2- forno
- 3- cristal piezoelétrico
- 4- oscilador
- 5- frequencímetro

Foi utilizado um cristal piezoelétrico com um revestimento de 1,10-decanoditiol, capaz de interagir com os compostos principais responsáveis pelo ranço da manteiga. O forno, feito no laboratório serviu para a desorção dos compostos voláteis responsáveis pela degradação da manteiga. Com o rotâmetro acoplado pretendeu-se controlar o gás de arraste que conduziu os compostos até à microbalança de cristais piezoelétricos, onde se verificou um decréscimo na sua frequência de vibração, detectada num frequencímetro e registada num computador.

8.5.2 Metodologia Experimental

Tal como se pode observar na figura anterior esta parte da experiência consiste em fazer passar um gás inerte com o caudal de 30 mL/min controlado por meio de um rotâmetro. De seguida este gás vai passar num forno, cuja temperatura é de 220 °C. A fibra é introduzida no forno e os compostos vão ser desorvidos e arrastados pelo gás até à

microbalança de cristais piezoelétricos. A variação de massa à superfície do cristal provoca uma variação proporcional na frequência de vibração, que é detectada no frequencímetro e registada num computador, que está ligado ao frequencímetro.

A fim de comparar a sensibilidade dos principais compostos presentes na manteiga no GC/MS e no sensor, foram injectados padrões de diversos compostos puros.

A sensibilidade do sistema fibra/sensor para os diversos compostos foi avaliada registando o decréscimo de frequência que se obteve quando se introduziu a fibra, que tinha estado anteriormente em contacto com uma solução, preparada em metanol com quantidades conhecidas de cada padrão. Os decréscimos de frequência dos compostos foram registados para quatro soluções com diferentes concentrações.

Os passos de desorção e a análise foram em tudo semelhantes aos utilizados para as amostras de manteiga.

8.5.3. Revestimento dos cristais piezoelétricos

8.5.3.1. Preparação do filme de decanoditol

8.5.3.1.1. Limpeza do cristal de ouro

Os cristais piezoelétricos foram mergulhados durante 10s na solução piranha preparada de fresco (H_2O_2/H_2SO_4 na proporção de 1:3). É necessário referir que o cristal é mergulhado apenas durante 10s, de modo a evitar a corrosão do ouro.

Os cristais são mergulhados sem molhar a base metálica com a ajuda de uma pinça, como se indica na figura 30, de forma a remover algum material orgânico adsorvido nos eléctrodos. Foram em seguida lavados com água MilliQ e secos com uma corrente de azoto.

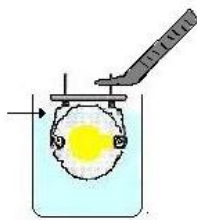


Figura 30- Cristal piezoelétrico mergulhado na solução piranha, utilizando uma pinça.

Depois do tratamento com a solução piranha submeteu-se o cristal a um tratamento electroquímico.

Foi feita uma voltametria cíclica, variando o potencial entre 0 e 0,8 V, com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s. Como eléctrodo de referência utilizou-se um eléctrodo Ag/AgCl, como eléctrodo auxiliar um eléctrodo de platina e como electrólito usou-se uma solução de KCl 1 M.

Antes de se proceder ao varrimento propriamente dito, fez-se borbulhar a solução com N₂, durante 10 minutos, de modo a se eliminar oxigénio.

Estes varrimentos de potencial foram aplicados em ambos os lados do cristal piezoeléctrico. O instrumento utilizado foi a microbalança Electroquímica Elchema 701.

A figura 31 mostra o voltamograma cíclico que se obteve nas condições adoptadas.

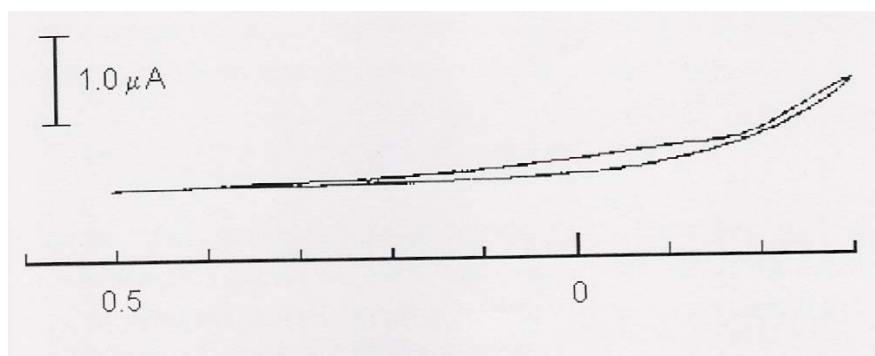


Figura 31- Voltamograma cíclico.

Depois de submeter o cristal a estes dois pré-tratamentos, este estava preparado para ser revestido.

8.5.3.1.2. Revestimento do cristal

O composto escolhido para revestir o cristal foi o 1,10 – decanoditiol [HS(CH₂)₁₀SH] uma vez que os aldeídos e cetonas ligam-se aos tióis [52].

A solução de revestimento foi preparada recorrendo a uma micropipeta para pipetar o volume de 53 μL de ditiol. A este adicionou-se 3,5 mL de etanol absoluto. Manteve-se o

cristal submerso, nesta solução, durante 55 horas e, ao ser retirado, foi lavado com água milliQ seguida de etanol absoluto em quantidade suficiente para eliminar o possível excesso de ditiol que não adsorveu à superfície de ouro. De seguida colocou-se o cristal no excicador até estar seco, para se ler a sua frequência. O revestimento provocou um decréscimo da frequência 5,0 kHz.

8.6. Avaliação sensorial

Na análise sensorial da manteiga efectuou-se o seguinte procedimento: retiraram-se duas porções com cerca de 30 g de manteiga, comprada de fresco, que se colocaram em dois frascos.

Os frascos foram fechados e devidamente identificados, sendo de seguida um dos frascos colocado numa estufa, que se encontrava à temperatura de 45° C, e o outro frasco num frigorífico, registando-se as horas a que se colocaram.

Um grupo de seis pessoas foi seleccionado para avaliar sensorialmente ambas as amostras da manteiga.

As amostras foram analisadas sensorialmente, de imediato e nos dias seguintes, registando-se a hora e a opinião de cada pessoa.

9. Resultados Experimentais e Discussão

9.1. Análise por cromatografia gasosa - espectrometria de massa

Em cada análise por GC-MS da manteiga obteve-se um cromatograma. A comparação dos cromatogramas obtidos ao longo do tempo ilustra a evolução da degradação da manteiga patente no aumento de certos picos com o mesmo tempo de retenção. Para melhor visualizar esta mesma degradação as figuras 32 a 42 ilustram os cromatogramas obtidos.

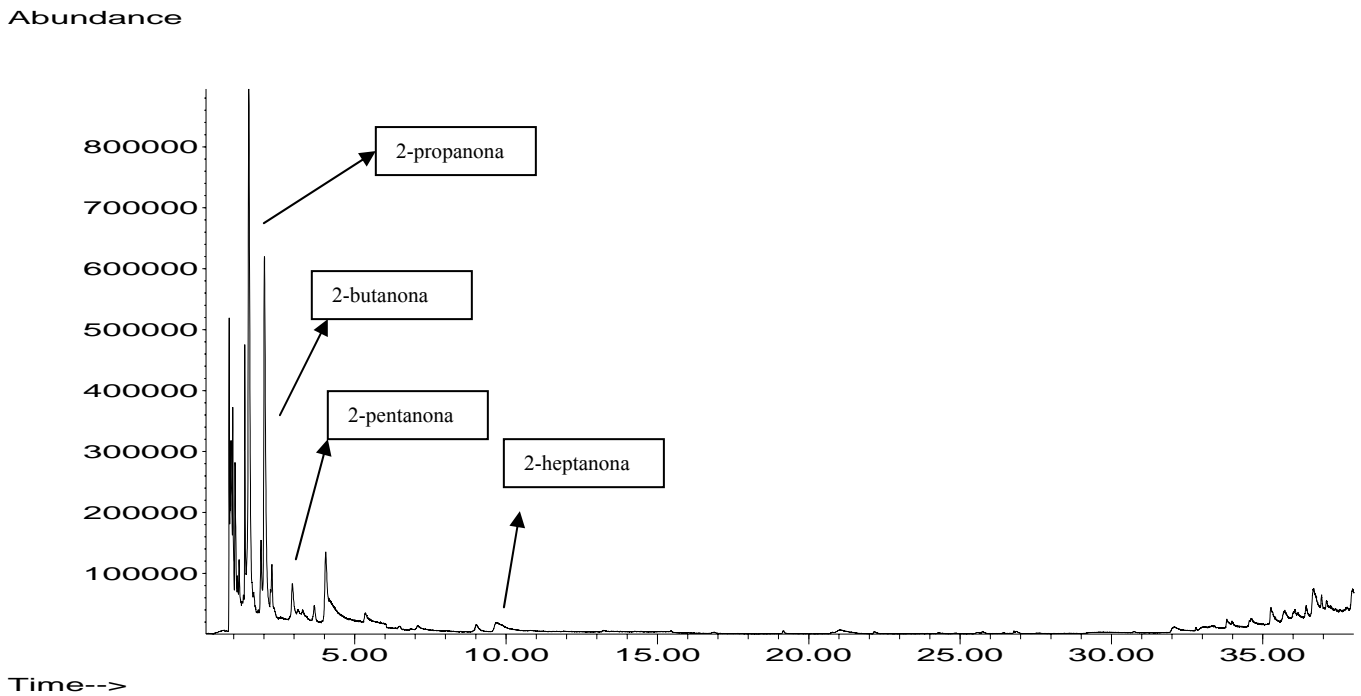


Figura 32- Cromatograma de uma manteiga às zero horas.

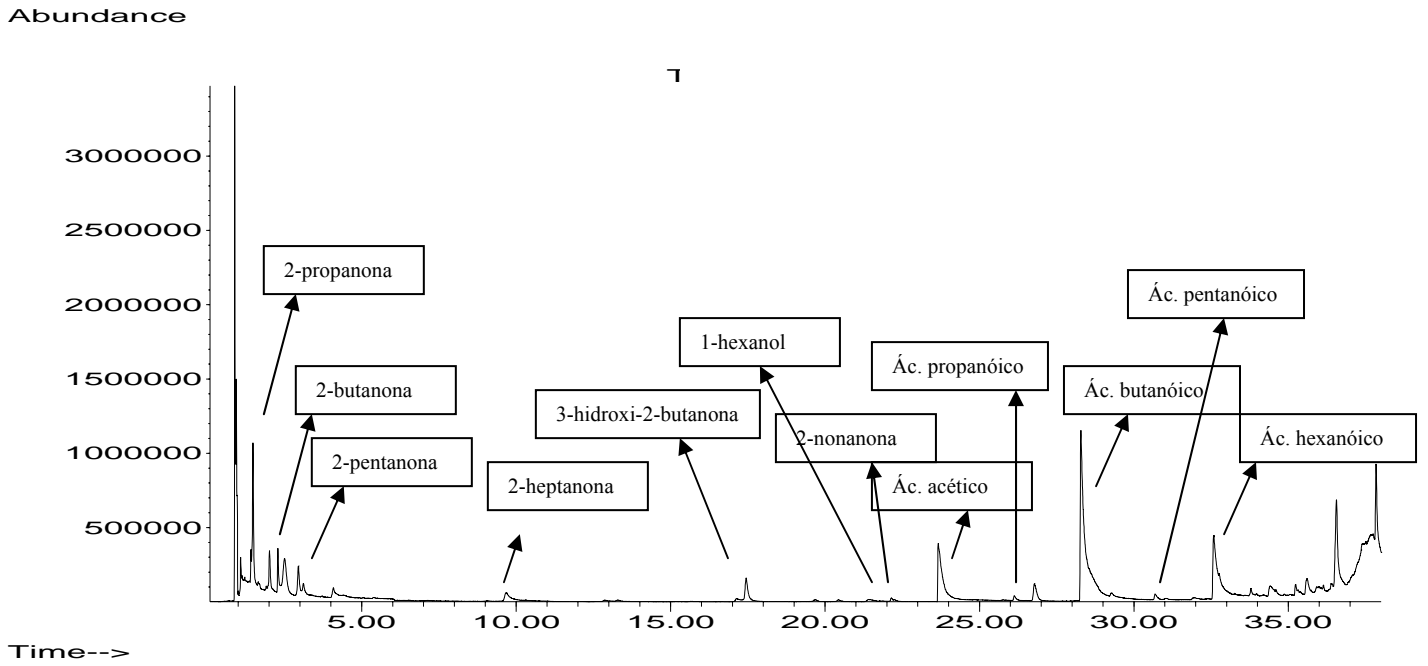


Figura 33- Cromatograma de uma manteiga às noventa e seis horas (4 dias).

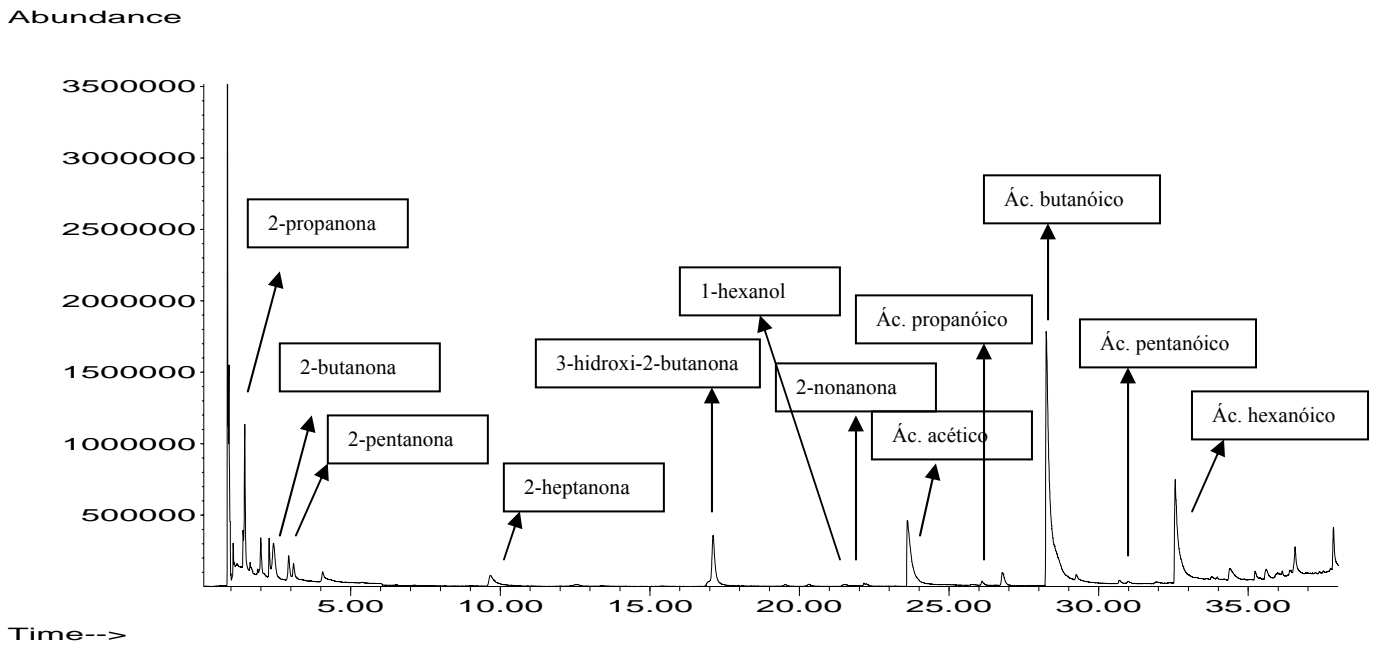


Figura 34- Cromatograma de uma manteiga às duzentas e catorze horas (8,9 dias).

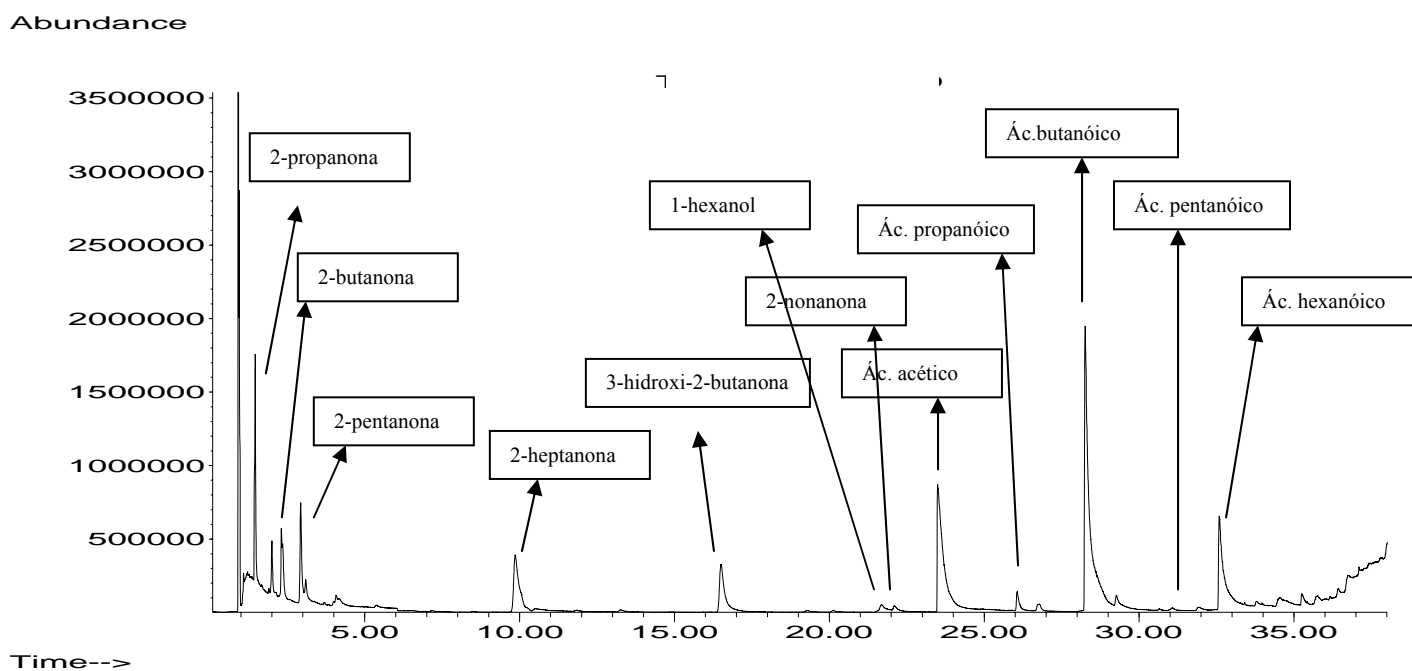


Figura 35- Cromatograma de uma manteiga às trezentas e vinte e sete horas (13,6 dias).

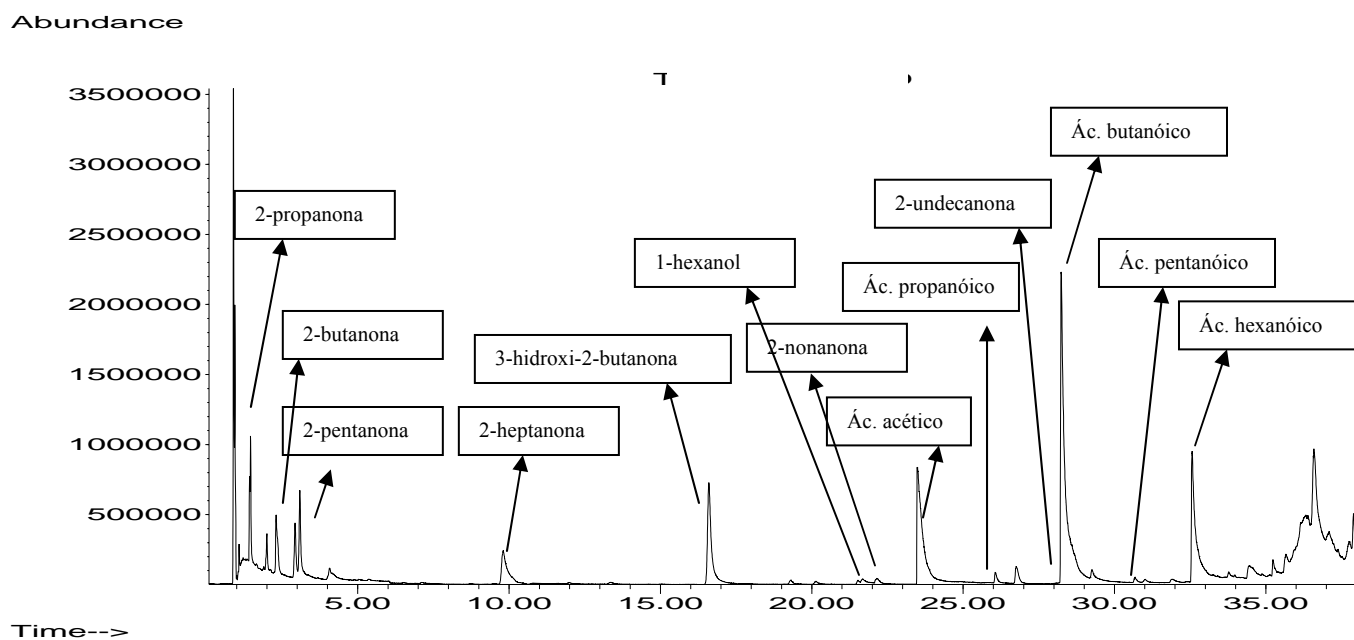


Figura 36- Cromatograma de uma manteiga às quatrocentos e quarenta e cinco horas (18,5 dias).

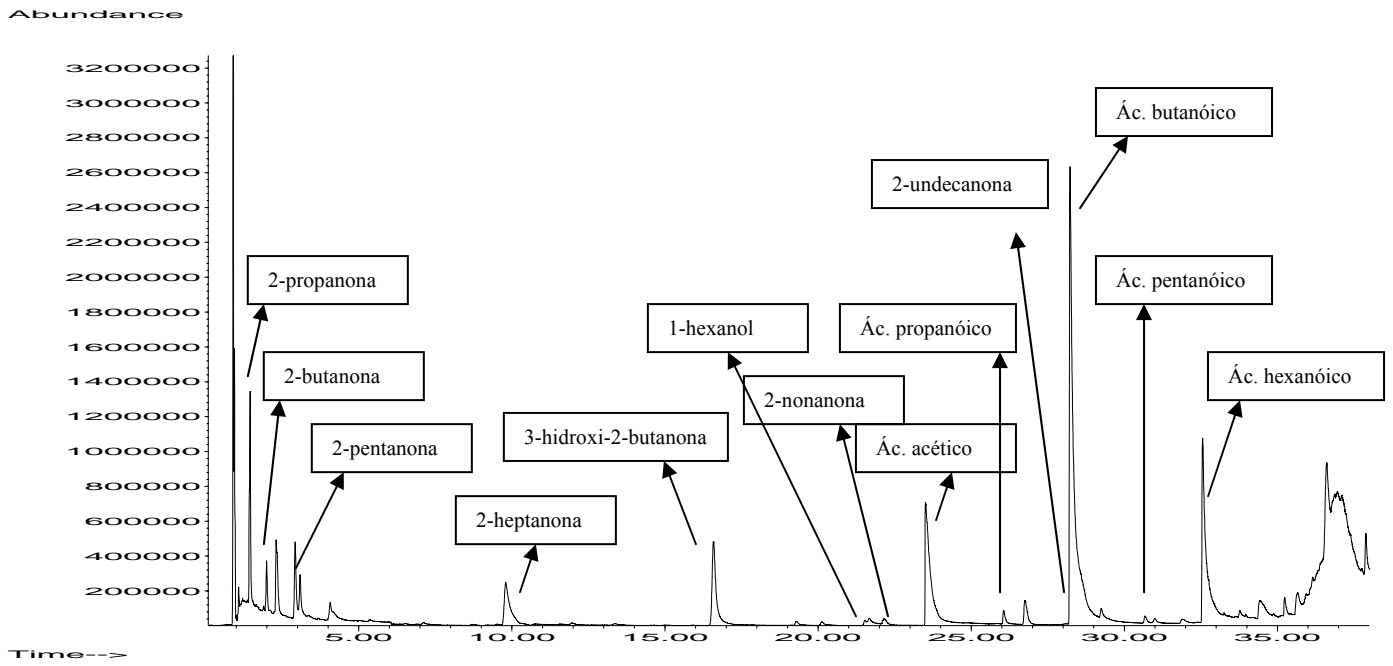


Figura 37- Cromatograma de uma manteiga às quinhentas e cinquenta horas (22,9 dias).

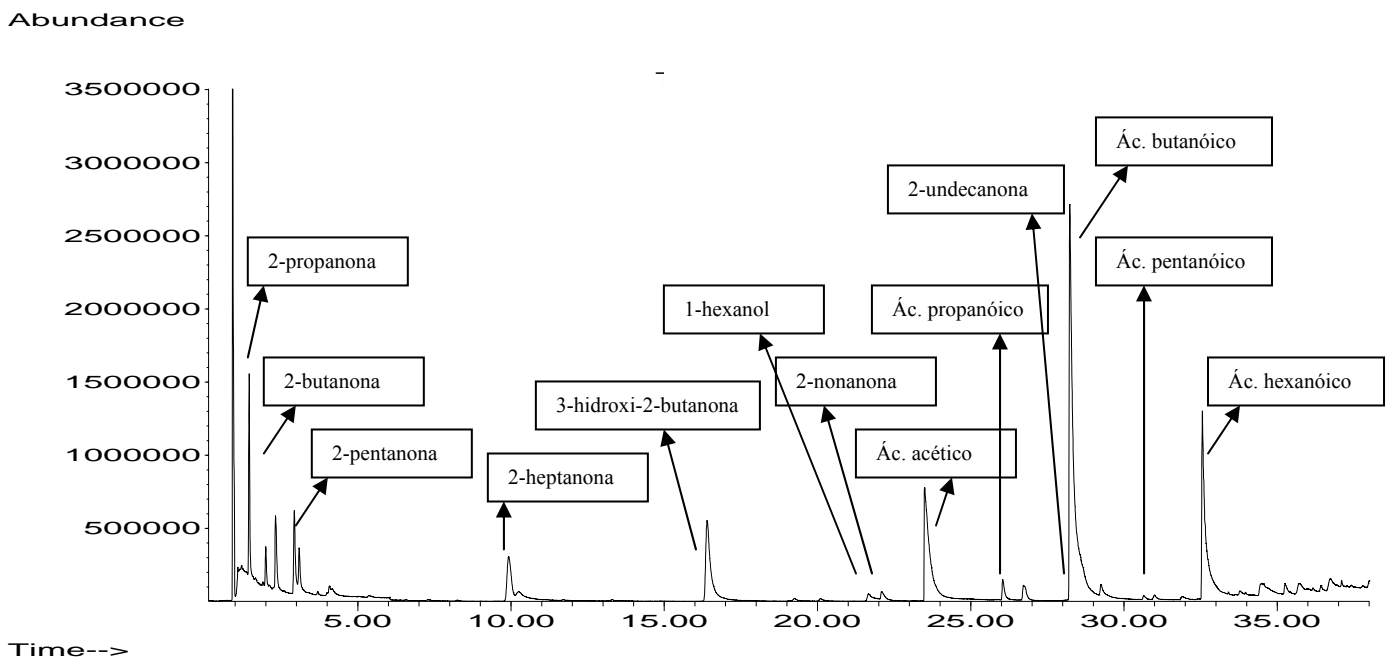


Figura 38- Cromatograma de uma manteiga às seiscentas e quarenta e uma horas (26,7 dias).

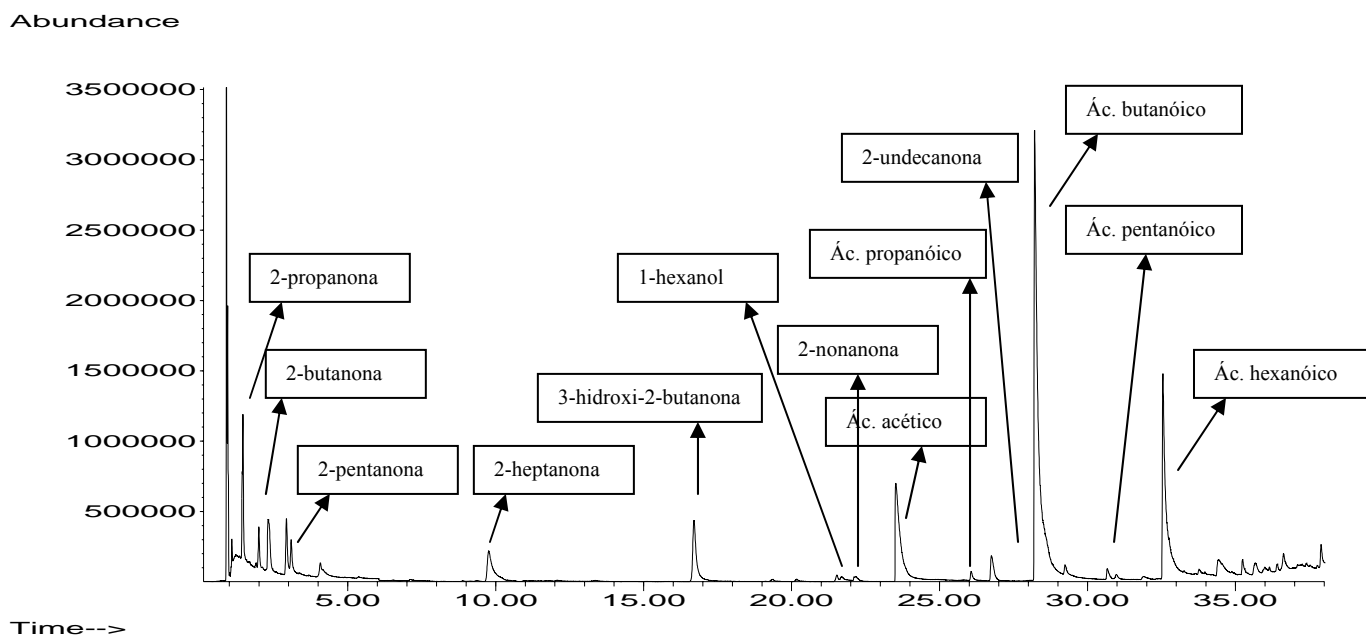


Figura 39- Cromatograma de uma manteiga às setecentas e quarenta e oito horas (31,2 dias).

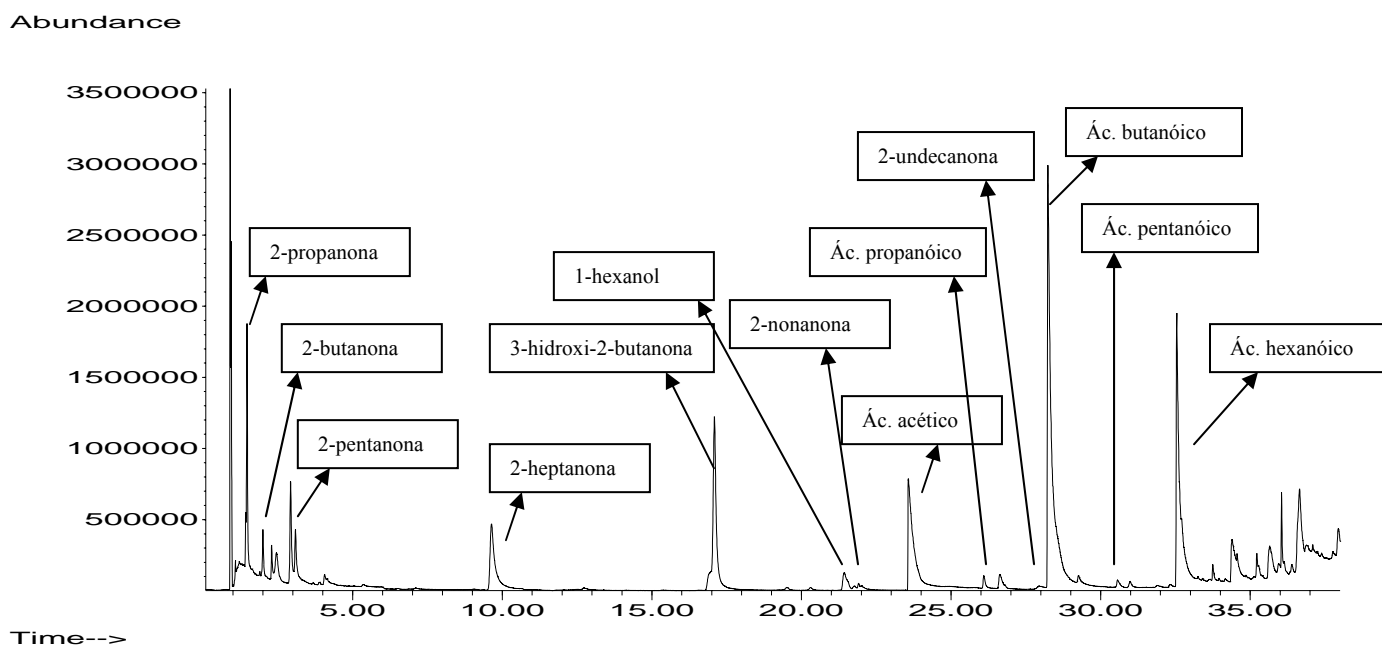


Figura 40- Cromatograma de uma manteiga às oitocentas e sessenta e quatro horas (36 dias).

Abundance

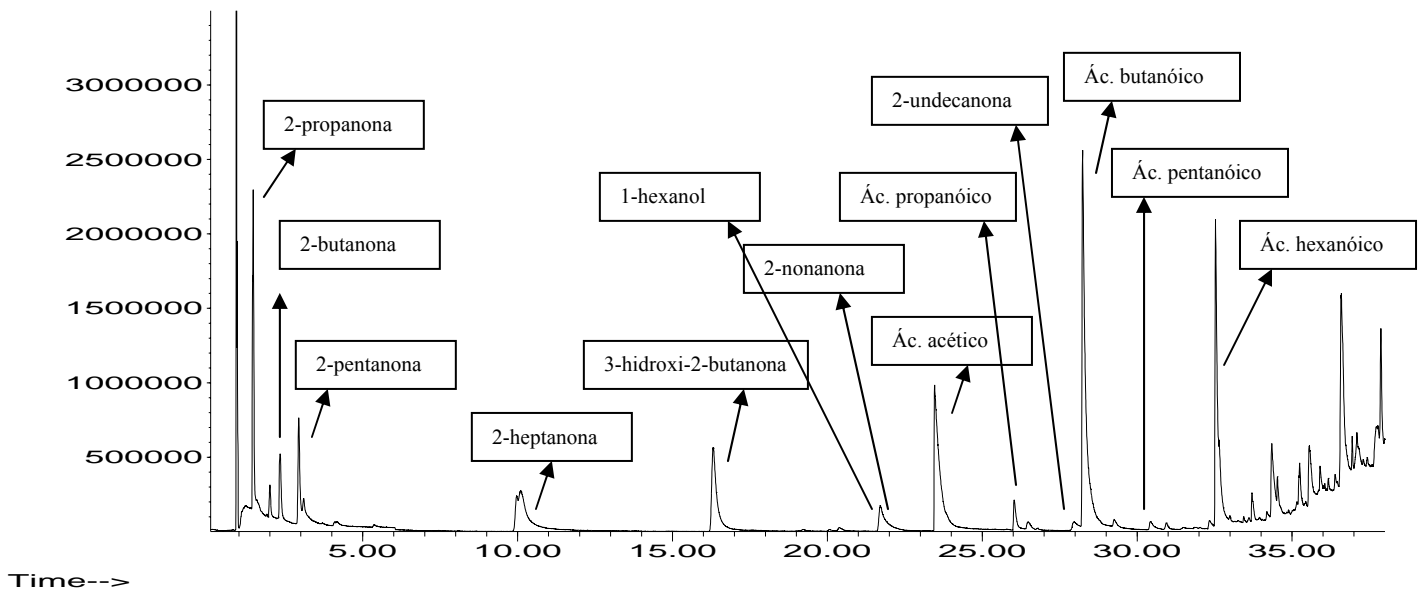


Figura 41- Cromatograma de uma manteiga às mil horas (41,6 dias).

Abundance

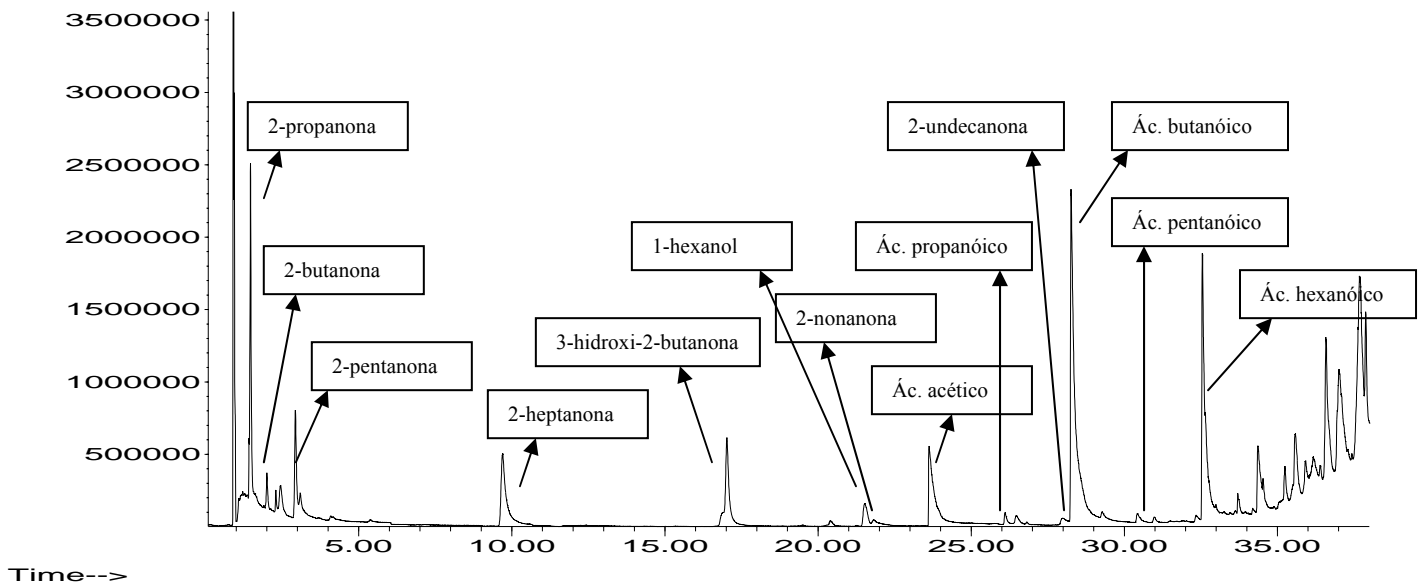


Figura 42- Cromatograma de uma manteiga às mil e cem horas (45,8 dias).

Os compostos foram identificados comparando os tempos de retenção e espectros de massa de cada um dos compostos com os tempos de retenção e espectros de massa dos compostos puros (padrões). Nas figuras 43 a 55 apresentam-se os espectros de massa correspondentes aos padrões em causa.

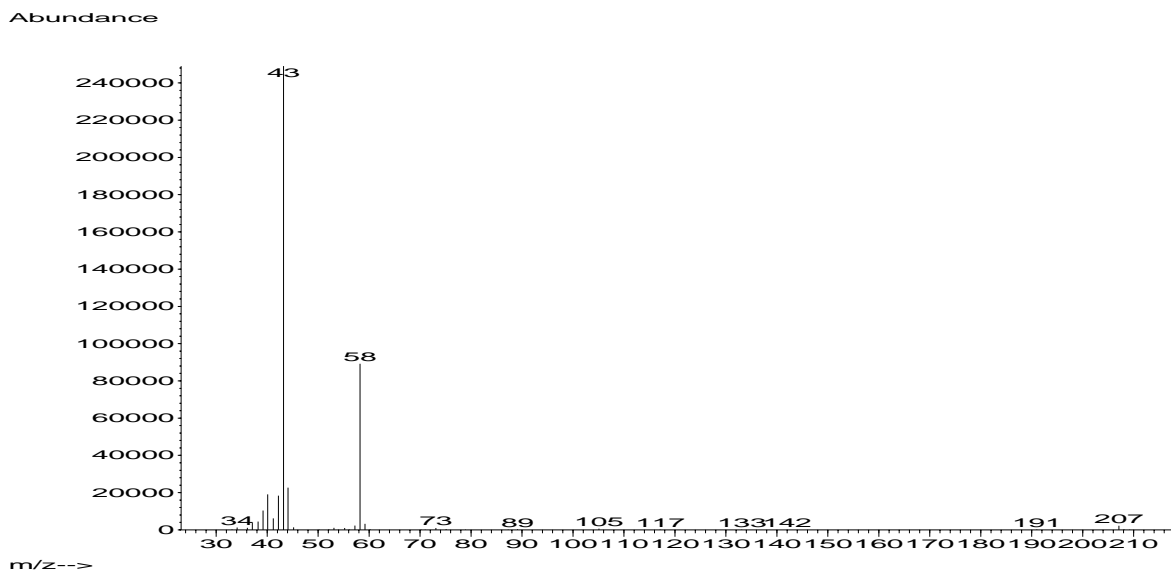


Figura 43-Espectro de massa da 2-propanona.

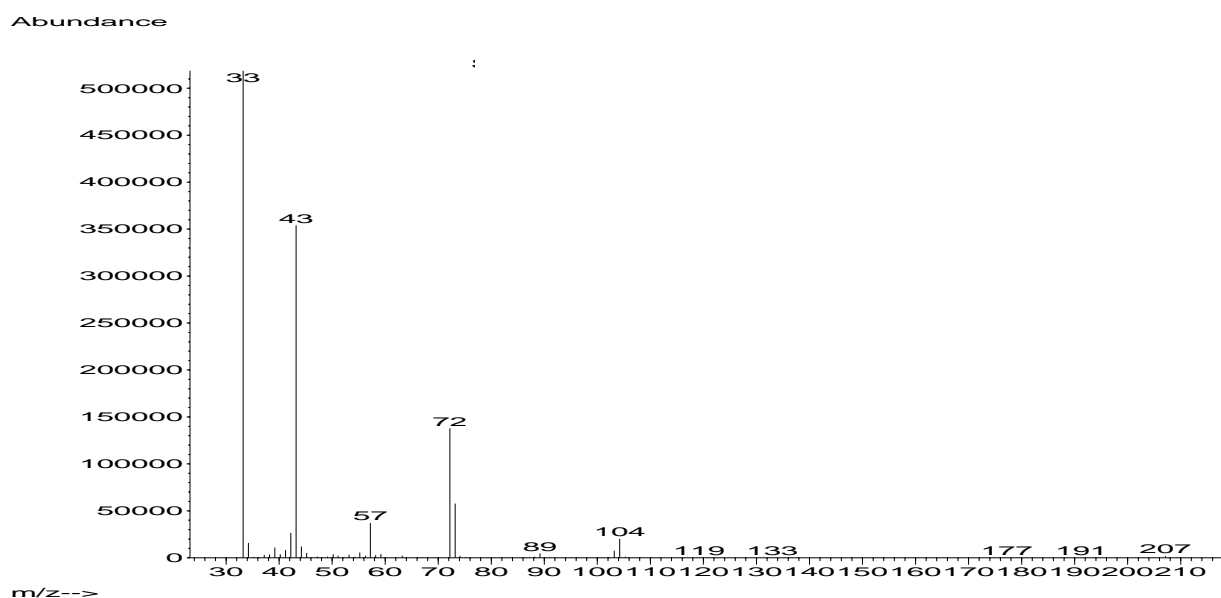


Figura 44-Espectro de massa da 2-butanona.

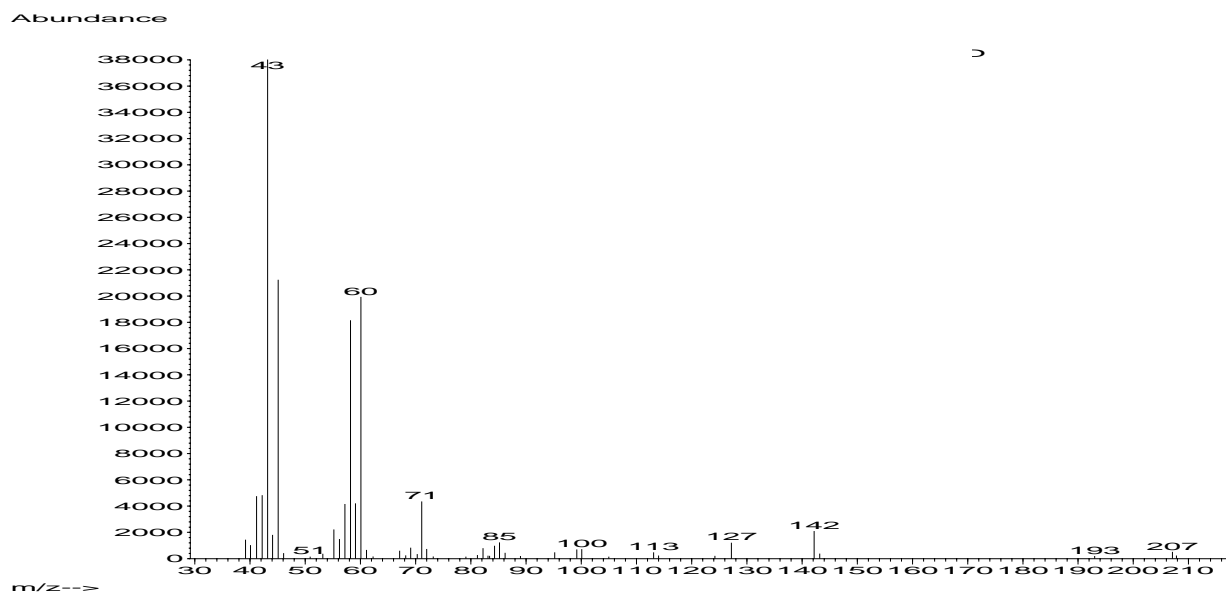


Figura 45- Espectro de massa da 2-pentanona.

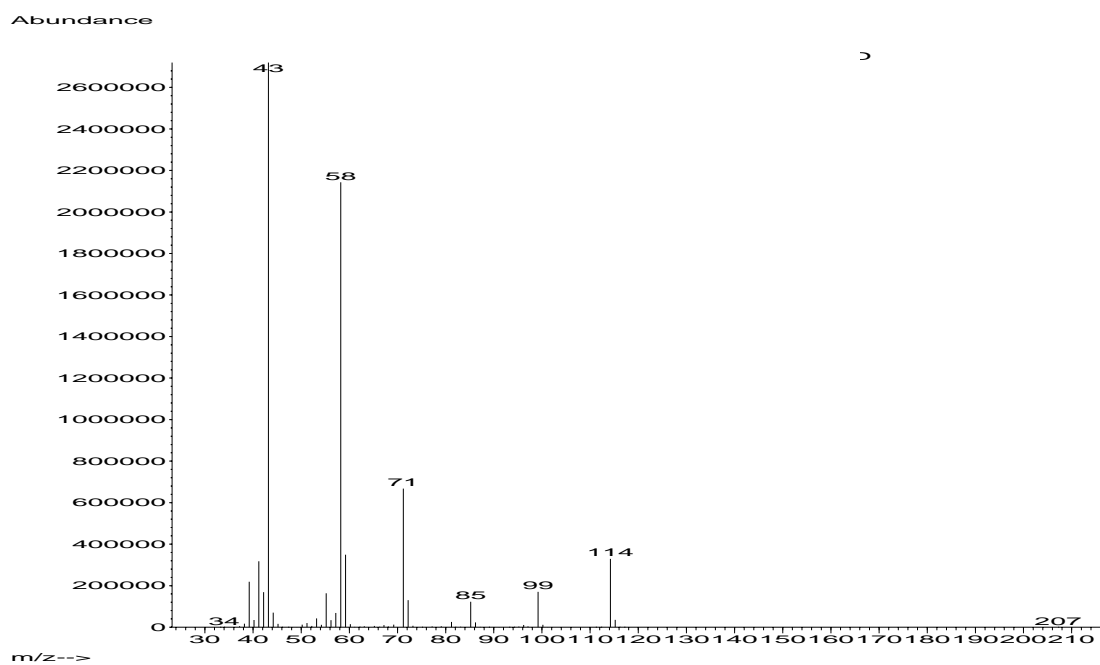


Figura 46- Espectro de massa da 2-heptanona.

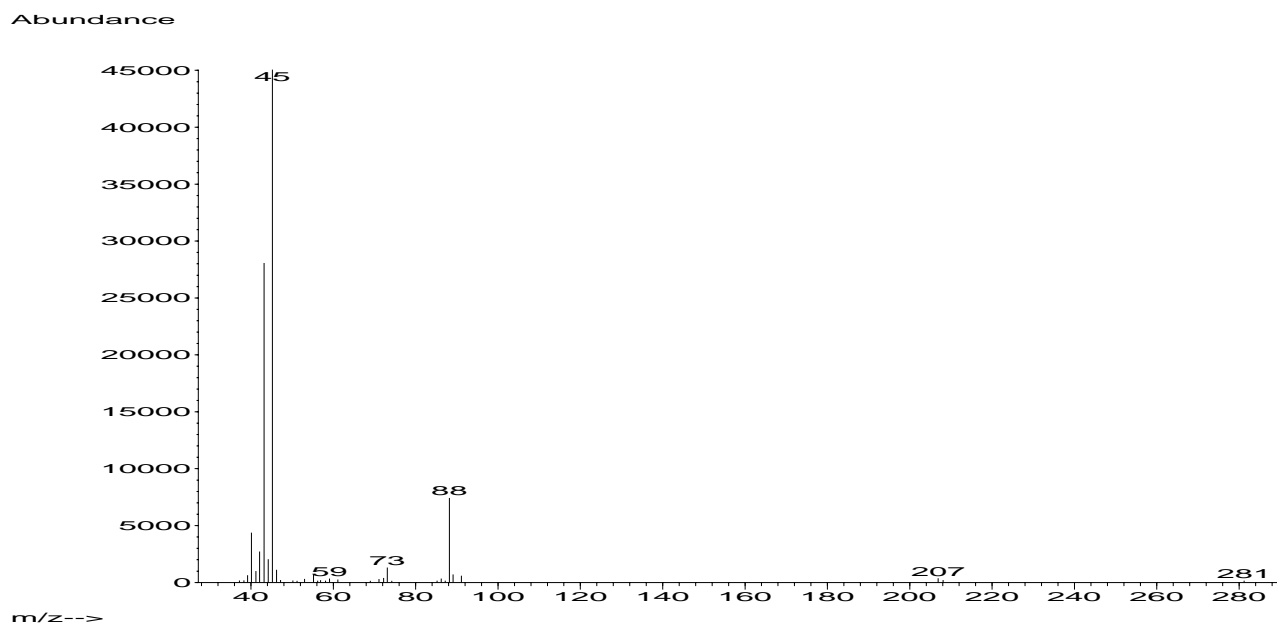


Figura 47 - Espectro de massa da 3-hidroxi-2-butanona.

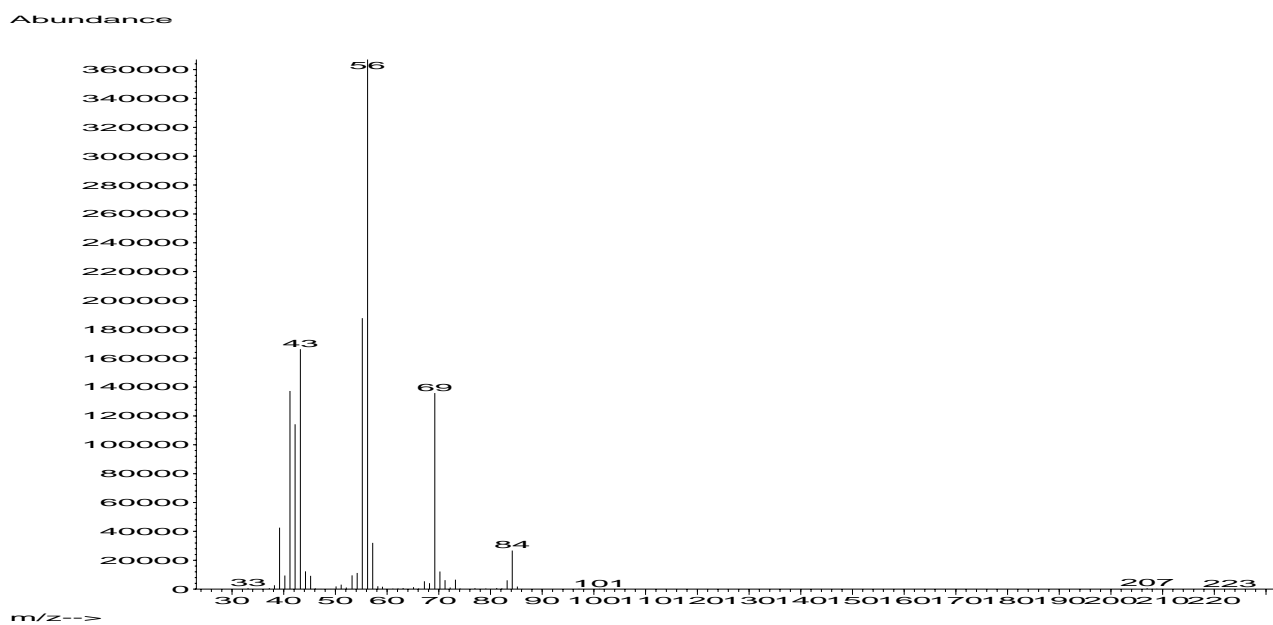


Figura 48- Espectro de massa do 1-hexanol.

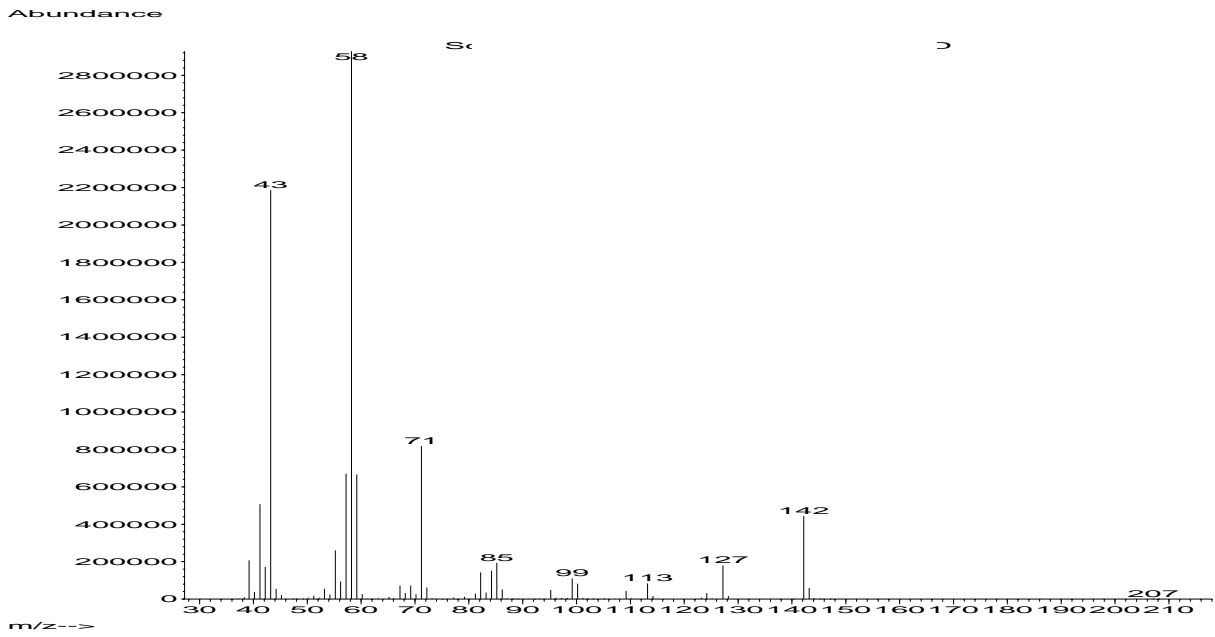


Figura 49- Espectro de massa da 2-nonanona.

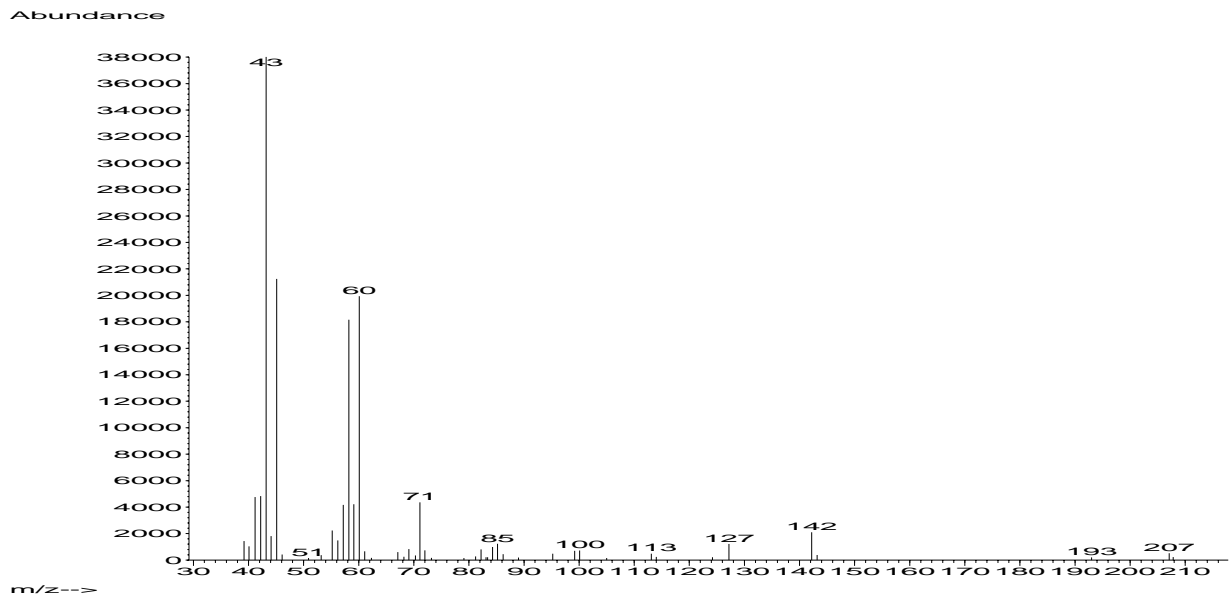


Figura 50- Espectro de massa do ácido acético.

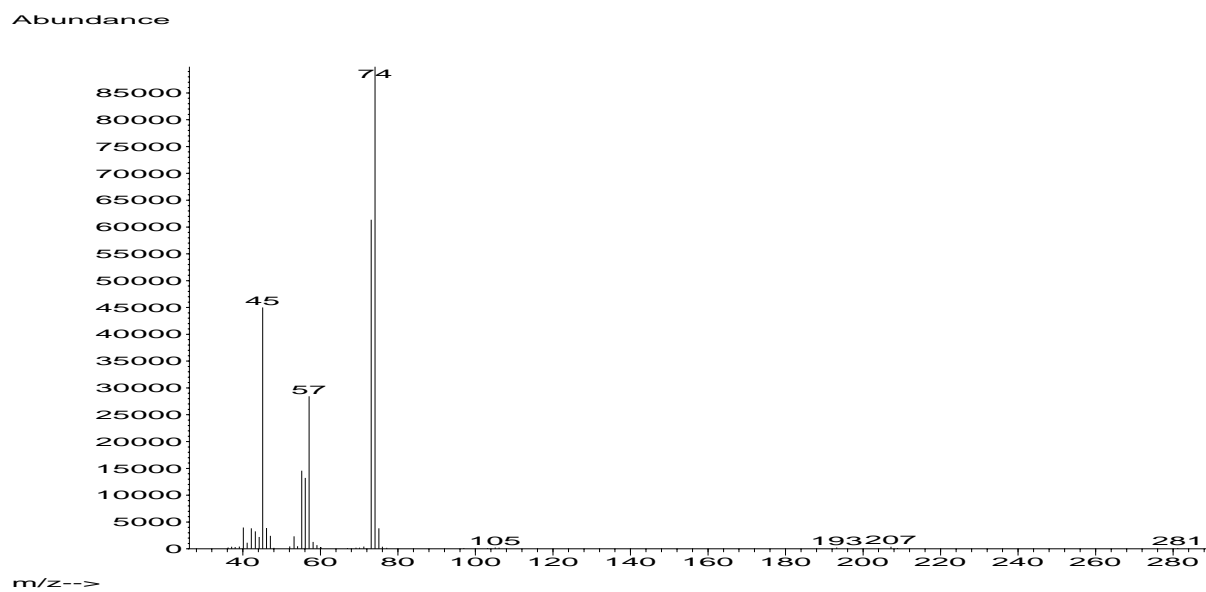


Figura 51-Espectro de massa do ácido propanóico

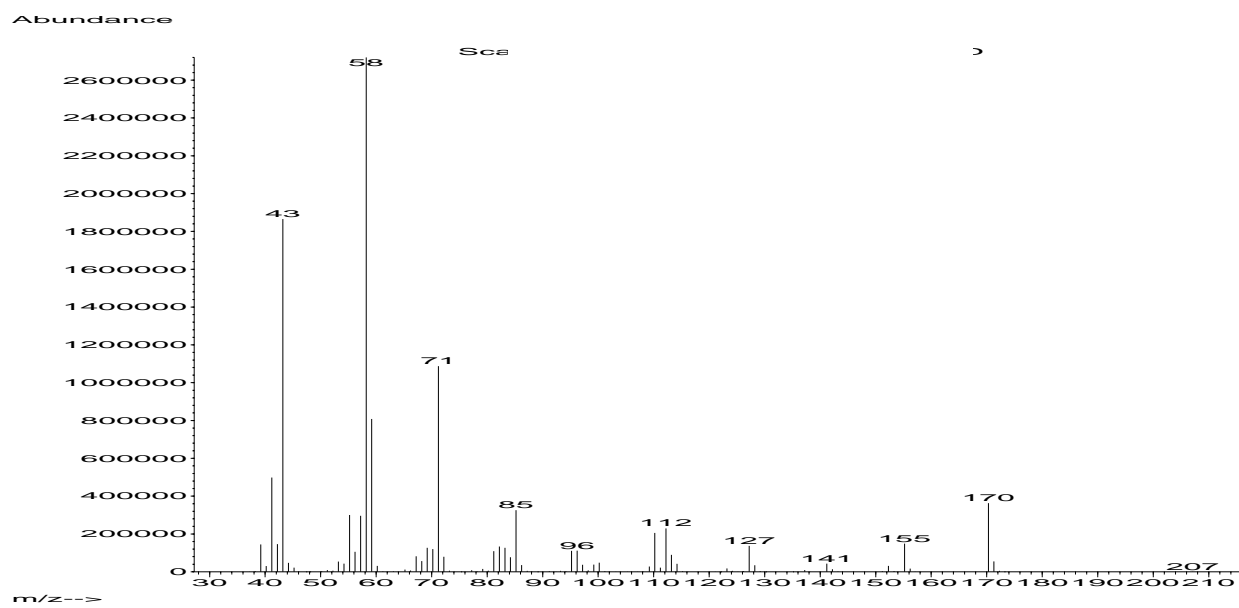


Figura 52-Espectro de massa da 2-undecanona.

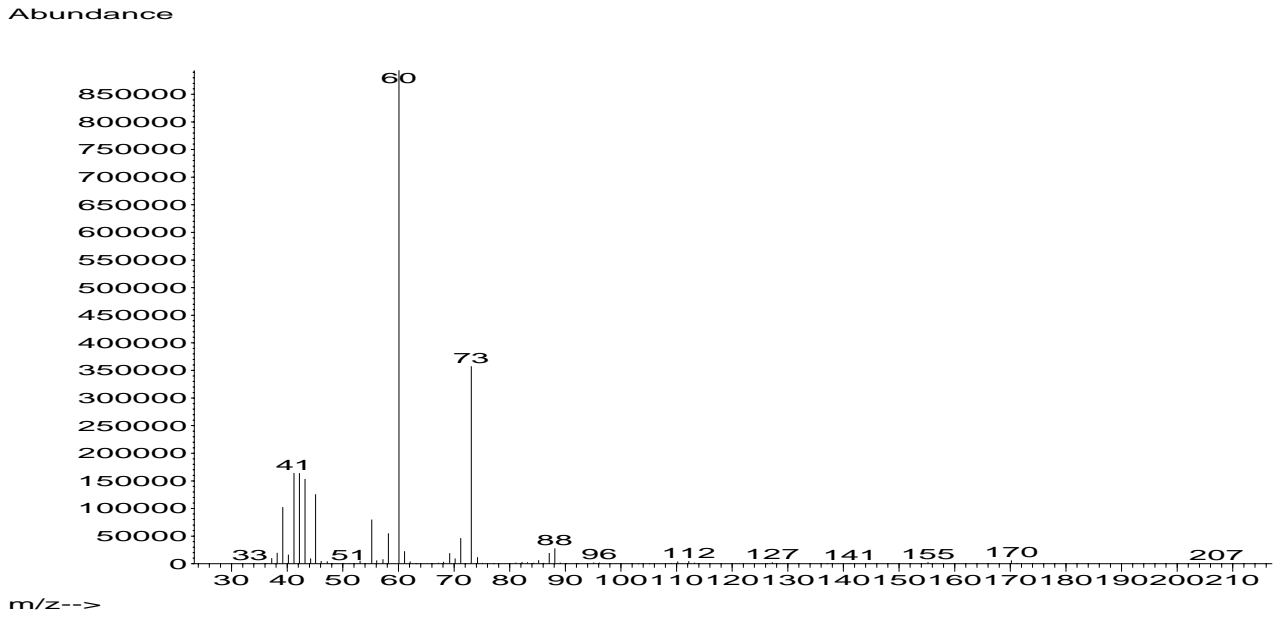


Figura 53-Espectro de massa do ácido butanóico.

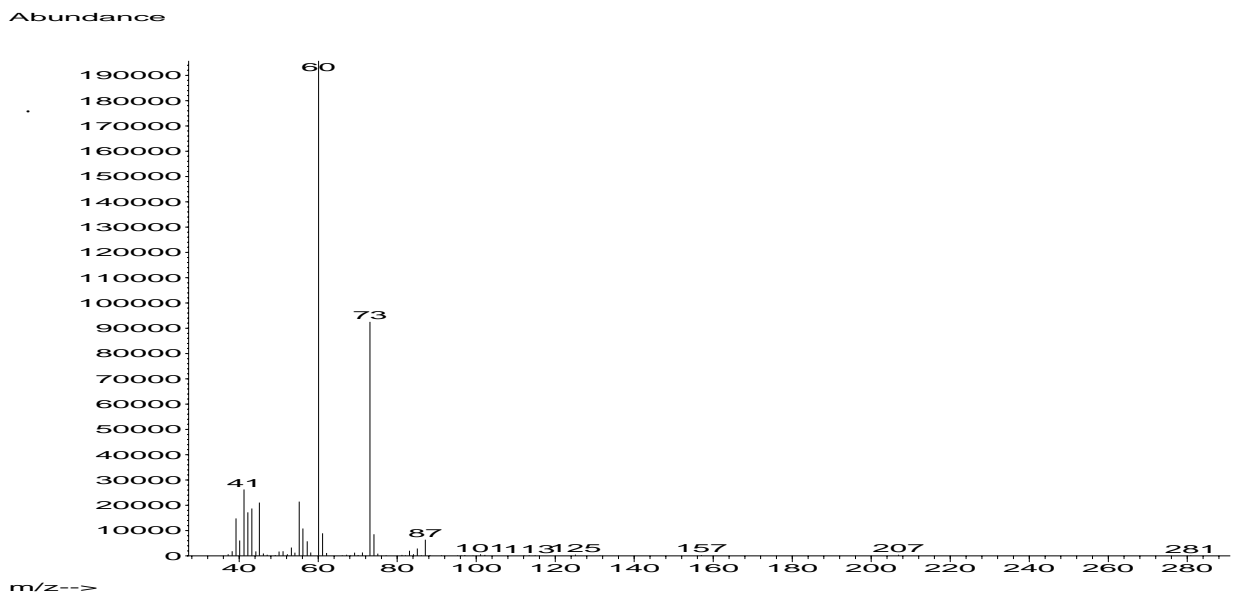


Figura 54-Espectro de massa do ácido pentanóico.

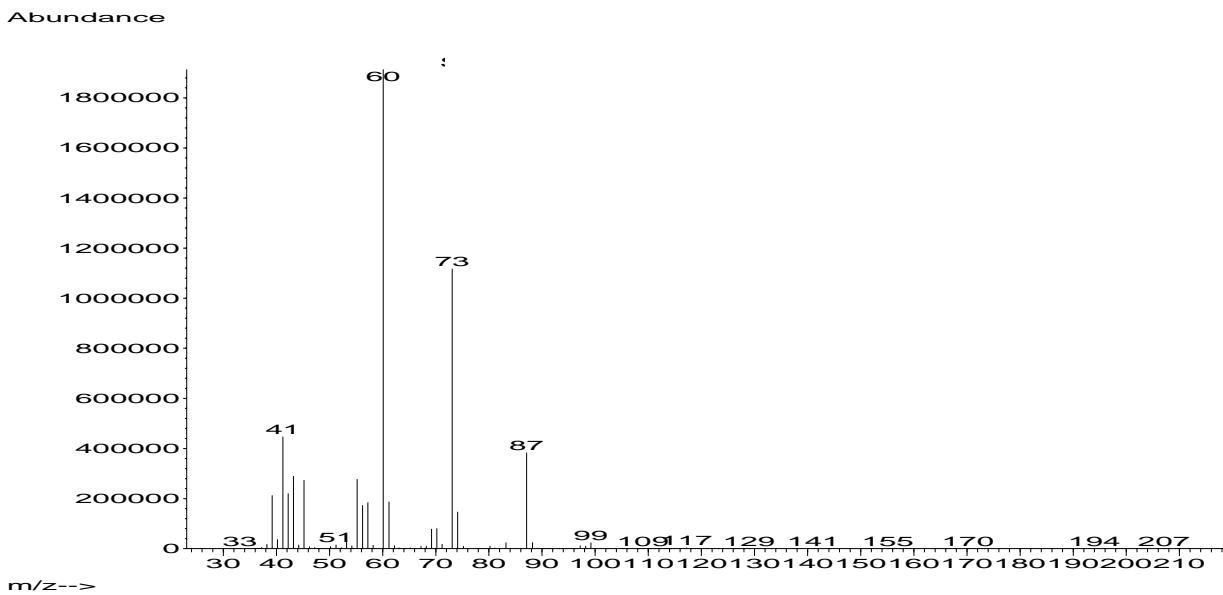


Figura 55-Espectro de massa do ácido hexanóico.

Os compostos da manteiga detectados pelo sistema fibra/GC/MS foram: 2-propanona, 2-butanona, 2-pentanona, 2-heptanona, 3-hidroxi-2-butanona, 1-hexanol, 2-nonanona, ácido acético, ácido propanóico, 2-undecanona, ácido butanóico, ácido pentanóico e ácido hexanóico.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado ou quadruplicado. Na tabela 5 pode ver-se o registo da mediana das áreas integradas dos picos dos compostos obtidos a partir do espaço de cabeça da manteiga, ao longo do tempo, bem como a amplitude dos resultados das réplicas, expressa em % relativamente à mediana.

9.1.1. Reprodutibilidade da análise por GC/MS

Tabela 5- Medianas e amplitude das áreas dos picos dos compostos dos cromatogramas da manteiga.

Compostos	2-propanona		2-butanona		2-pentanona		2-heptanona	
	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)
0	2,44	1,51	0,13	2,38	0,16	1,44	0,37	2,44
96	2,43	0,76	0,15	2,85	0,67	0,62	0,72	0,06
214	2,56	2,80	0,21	3,07	0,94	3,90	1,00	3,71
327	2,86	0,74	0,48	0,64	1,27	2,21	2,66	6,97
445	3,52	4,08	0,87	4,43	3,42	4,48	4,87	0,59
550	4,07	0,83	1,23	0,45	3,78	0,25	5,02	0,77
641	4,87	1,83	0,72	0,23	4,39	2,36	5,31	2,25
748	5,63	1,09	0,71	0,27	4,73	1,50	5,40	0,15
864	7,65	0,38	0,64	1,30	4,95	0,73	6,15	0,80
1000	8,87	0,29	0,64	0,39	5,17	0,66	6,80	0,46
1100	9,18	0,28	0,80	13,82	5,14	0,82	6,88	0,68

Compostos	3-hidroxi-2-butanona		1-hexanol		2-nonanona		ácido acético	
	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)
0	0,00	0,00	0,12	1,61	0,00	0,00	0,00	0,00
96	1,53	3,57	0,15	8,51	0,15	1,70	3,81	5,74
214	2,18	0,37	0,17	4,68	0,24	4,71	7,49	4,22
327	2,18	1,10	0,97	5,11	0,45	0,36	8,44	0,22
445	9,01	0,85	1,25	0,53	0,71	3,27	9,58	1,04
550	8,73	0,42	2,85	0,01	1,02	1,04	9,80	0,91
641	9,21	0,17	3,65	1,64	1,59	4,89	9,55	0,14
748	9,51	0,08	4,03	0,00	2,32	0,84	9,63	0,23
864	11,64	0,59	4,21	5,82	2,82	4,12	9,52	0,53
1000	9,63	1,04	4,71	1,50	2,95	0,00	10,05	0,75
1100	9,52	0,90	4,69	1,06	2,84	3,13	9,92	0,69

Compostos	ácido propanóico		2-undecanona		ácido butanóico		ácido pentanóico		
	tempo (h)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
96	0,65	7,79	0,00	0,00	17,51	0,06	0,21	0,30	
214	0,82	0,27	0,00	0,00	19,60	0,66	0,33	1,78	
327	0,83	1,82	0,00	0,00	21,05	0,32	0,38	0,50	
445	0,84	0,51	0,36	1,08	22,17	0,48	0,45	7,39	
550	1,02	0,87	0,38	0,70	22,70	0,53	0,46	0,39	
641	1,68	0,43	0,39	0,92	23,18	0,24	0,49	3,14	
748	1,89	1,17	0,42	0,61	23,37	0,17	0,50	0,49	
864	1,96	1,39	0,48	0,88	23,20	0,64	0,53	1,14	
1000	1,96	2,60	0,49	0,30	23,05	0,28	0,55	0,06	
1100	1,83	3,43	0,50	3,09	23,08	0,31	0,56	1,04	

Compostos	ácido hexanóico		
	tempo (h)	Mediana x 10 ⁻⁷	Amplitude/mediana (%)
0	0,13	2,05	
96	1,38	0,21	
214	4,99	3,19	
327	8,47	2,52	
445	9,55	0,63	
550	11,27	0,14	
641	12,66	0,38	
748	13,04	0,18	
864	13,56	0,38	
1000	13,83	0,30	
1100	13,82	0,08	

Utilizando estes resultados foi elaborado o gráfico da figura 56, que mostra as medianas das áreas dos picos cromatográficos para compostos formados durante a degradação da manteiga.

Para tornar mais fácil a visualização dos compostos com áreas cromatográficas menores, retiraram-se da figura os compostos mais abundantes, dando a mesma lugar à figura 57.

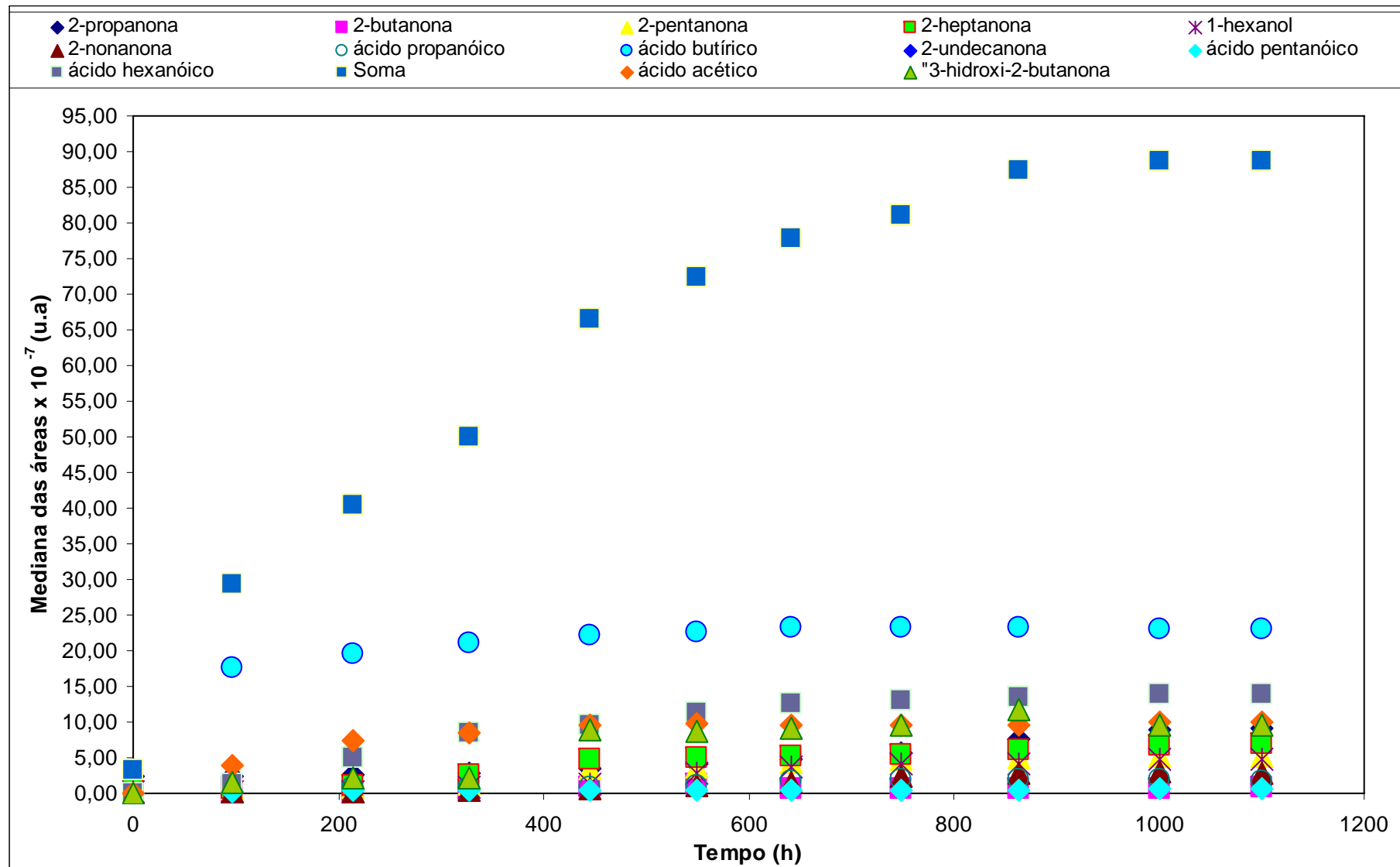


Figura 56- Gráfico das medianas das áreas dos picos cromatográficos dos diversos compostos em função do tempo.

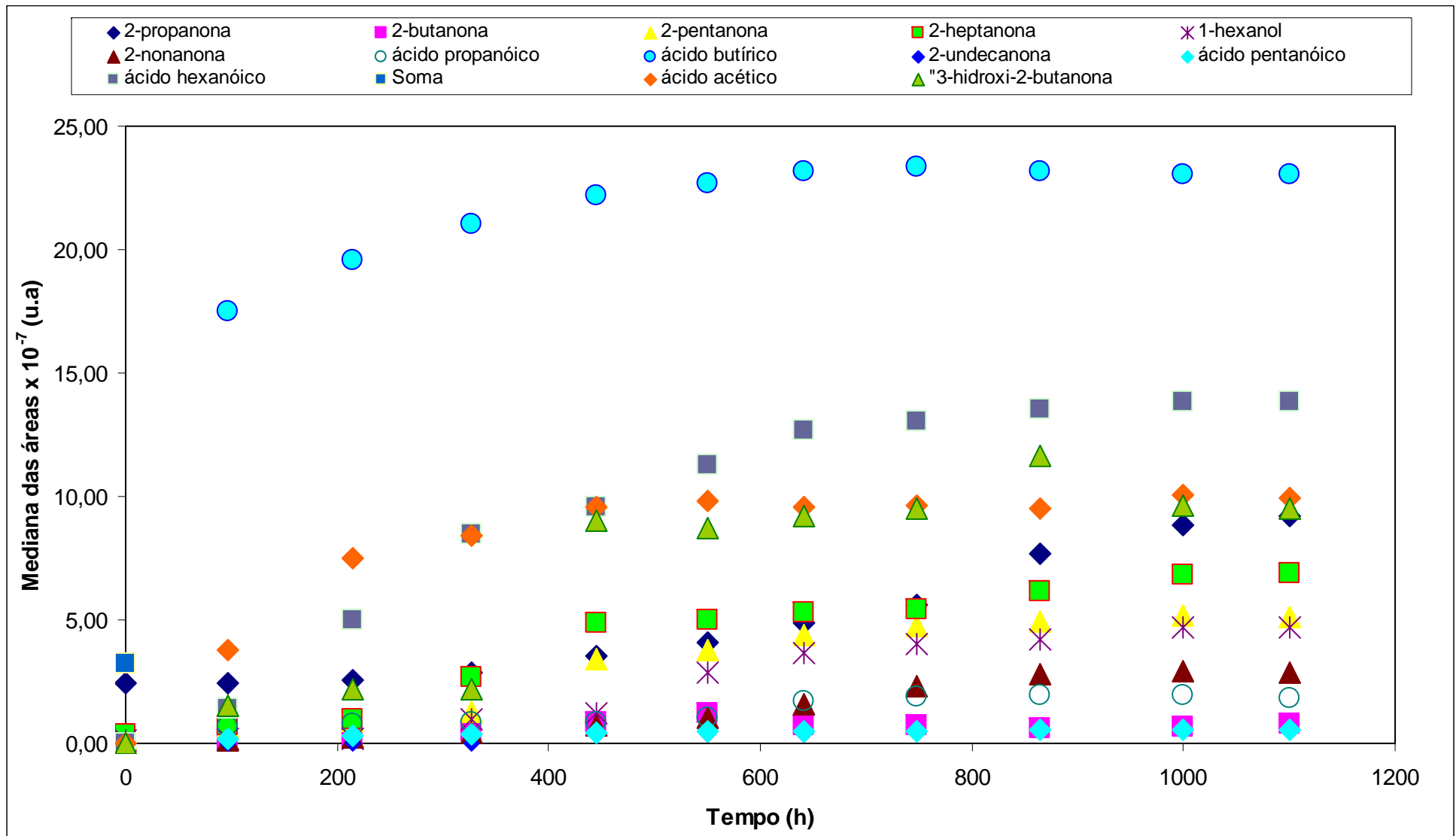


Figura 57 - Medianas das áreas dos picos cromatográficos dos diversos compostos em função do tempo, numa escala mais ampliada.

9.1.2. Sensibilidade do sistema fibra/GC/MS

De forma estudar a sensibilidade do sistema fibra/GC/MS, colocou-se a fibra a adsorver em espaço de cabeça, soluções de diferentes concentrações de cada um dos compostos em metanol, seguindo-se a desorção da mesma no GC-MS. Com os cromatogramas obtidos integraram-se as áreas dos picos dos padrões, calculando-se a sensibilidade do sistema pelos declives das rectas de calibração representando a área de cada pico cromatográfico em função da concentração do composto correspondente. Na figura 58 representam-se as rectas de calibração utilizadas no cálculo das sensibilidades da tabela 6.

Tabela 6- Registo da sensibilidade do sistema fibra/GC/MS para cada composto.

Padrões	Sensibilidade (u.a.mol⁻¹.L)
2-propanona	0,74 ± 0,04
2-butanona	0,87 ± 0,05
2-pentanona	1,03 ± 0,05
2-heptanona	4,2 ± 0,2
3-hidroxi-2-butanona	0,33 ± 0,02
1-hexanol	1,10 ± 0,01
2-nonanona	3,5 ± 0,3
ácido acético	0,19 ± 0,03
2-undecanona	1,9 ± 0,1
ácido propanóico	0,24 ± 0,01
ácido butanóico	1,79 ± 0,05
ácido pentanóico	0,109 ± 0,002
ácido hexanóico	0,038 ± 0,004

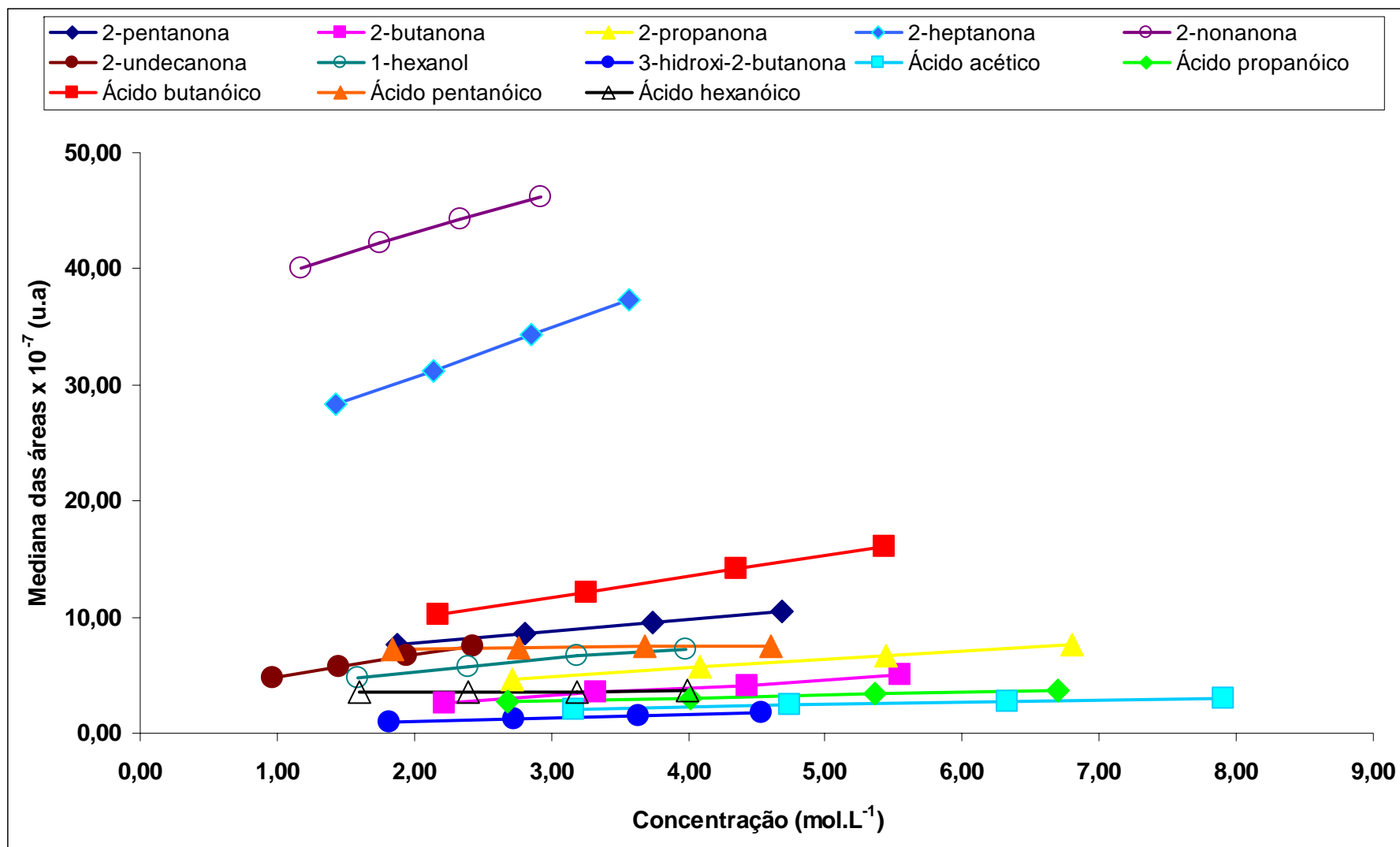


Figura 58- Gráfico das rectas de calibração dos diversos compostos obtidos com o sistema fibra/GC/MS.

9.2. Respostas do sensor em contacto com os compostos voláteis da manteiga

Como já se disse anteriormente, é necessário que o cristal piezoeléctrico revestido seja sensível aos compostos mais importantes da degradação da manteiga, mas também que essa interacção seja reversível.

Na figura 59 apresentam-se os sinais obtidos com o sensor em contacto com os compostos voláteis da manteiga. Nas figuras, 60, 61 e 62 apresentam-se alguns dos sinais do sensor obtidos por desorção da fibra em contacto com o espaço de cabeça dos porta-amostras com os compostos mais importantes que se sabem poder resultar da degradação da manteiga.

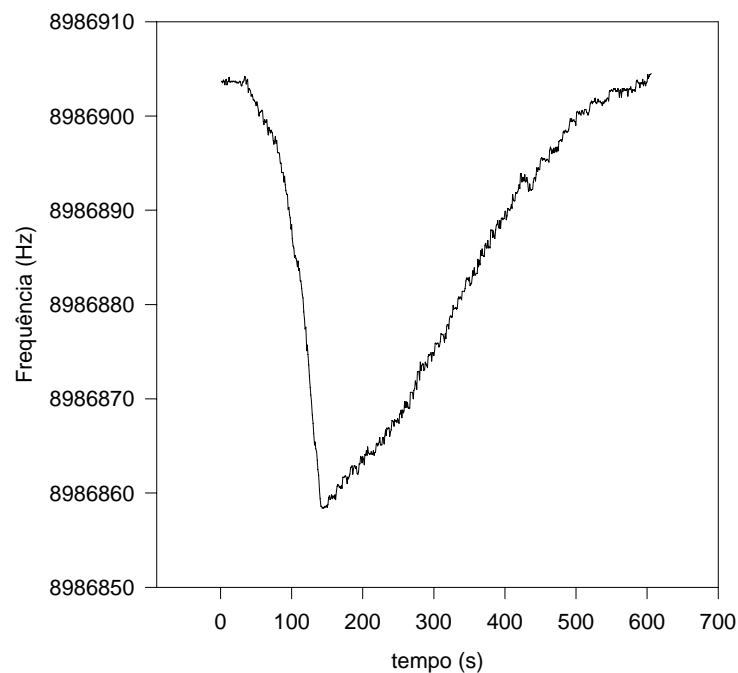


Figura 59- Curva da resposta do sensor à manteiga.

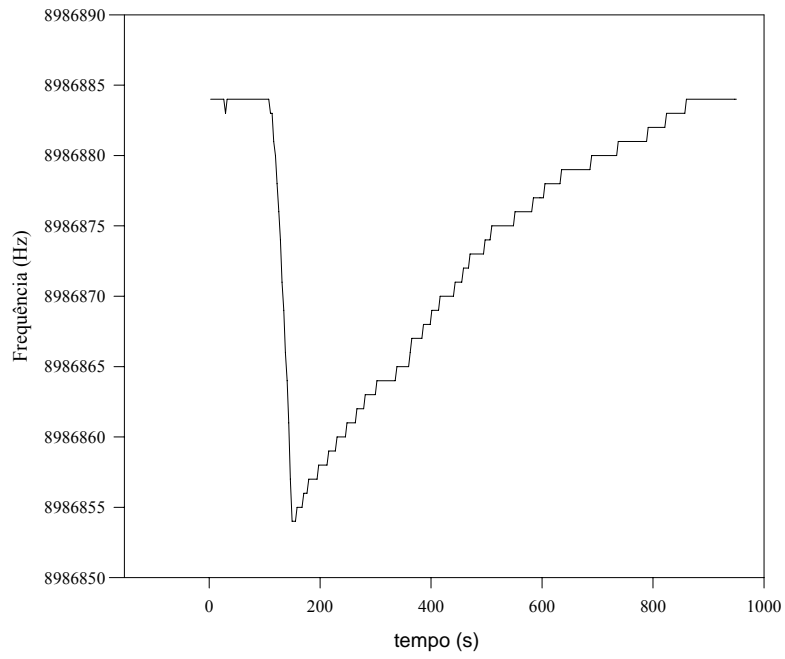


Figura 60- Curva da resposta do sensor à 2-pentanona.

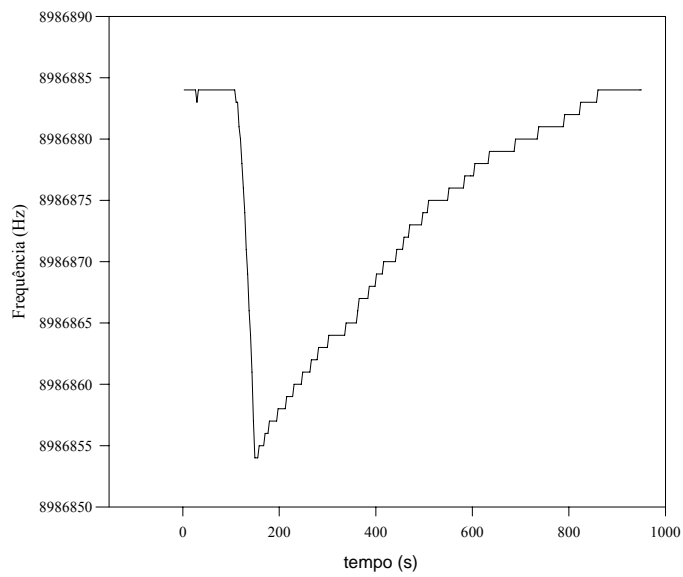


Figura 61- Curva da resposta do sensor à 2-heptanona.

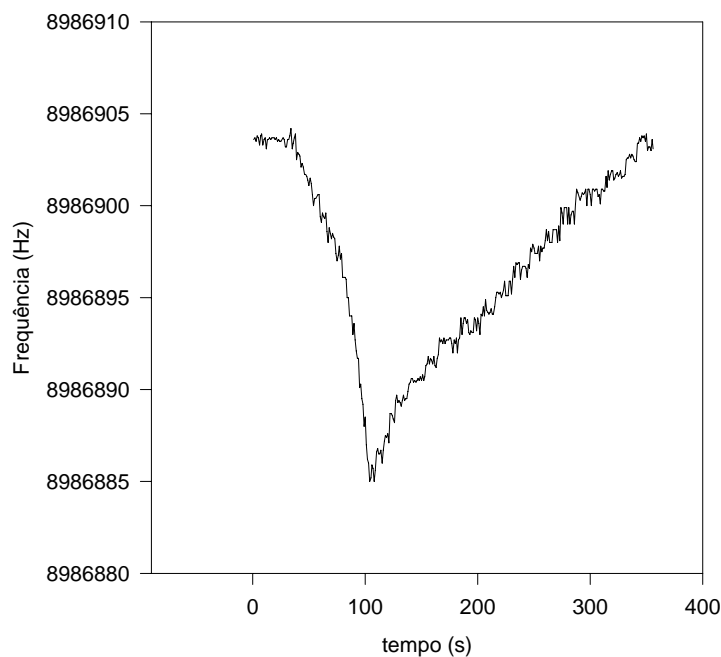


Figura 62- Curva da resposta do sensor à 2-nonanona.

Observando a forma dos sinais obtidos com o sensor, verifica-se que em todos os casos, incluindo a análise das amostras de manteiga, as respostas foram rápidas e a reversibilidade completa.

Na tabela 7 apresentam-se as respostas do sensor para cinco amostras de manteiga, obtidas ao longo do tempo.

Um único cristal revestido com ditiol ($\Delta F_{\text{revestimento}} = 5,0 \text{ kHz}$) foi utilizado em todas estas experiências.

Tabela 7- Respostas do sensor para as cinco amostras de manteiga.

Amostras de Manteiga	Amostra I (Dezembro)	Amostra II (Fevereiro)	Amostra III (Março)	Amostra IV (Abril)	Amostra V (Maio)
Tempo (h)	ΔF (Hz)	ΔF (Hz)	ΔF (Hz)	ΔF (Hz)	ΔF (Hz)
0,00	-8	-7			
52,35	-13				-13
65,56				-13	
127,55		-14			
167,52	-15				
214,08		-16			
255,73				-17	
265,13	-18				-18
327,17		-19			
357,00			-20		
388,22	-21				-21
432,12	-23				-23
448,25				-24	
498,00		-26			
501,87	-27				-27
536,13	-30				-30
550,08		-32			
552,00				-33	
557,77	-33				
579,93	-36				-36
598,00			-39		
604,68	-40				-40
627,50				-42	
641,00		-43			
648,02	-43				
702,68	-46				-46
744,00	-48				-48
813,33		-49			
816,18	-50				
870,63	-51				-51
940,48	-52				
984,00		-52			
1034,80	-53				-53
1246,90	-53				

Utilizando estes resultados foi elaborado um gráfico da frequência em função do tempo, figura 63, no qual estão ilustrados com diferentes cores as respostas das cinco amostras da manteiga.

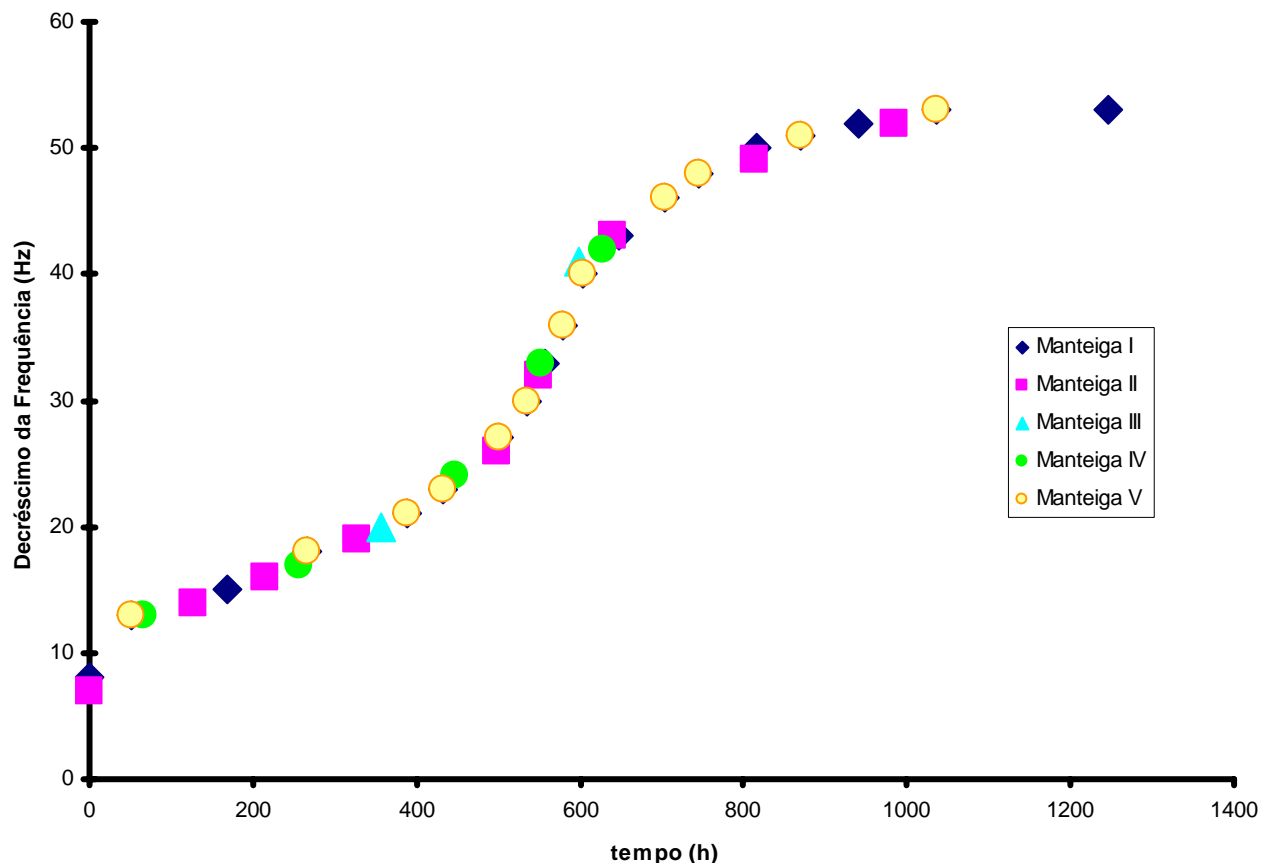


Figura 63 – Representação gráfica do decréscimo da frequência ao longo do tempo.

9.2.1. Reprodutibilidade do sistema fibra/sensor

De forma a verificar a reprodutibilidade do sensor e a poder utilizar todos os dados das cinco amostras da manteiga foram efectuadas doze medições da amostra V da manteiga a doze tempos exactamente iguais a medições que possuíamos para a amostra I. Entre a amostra I da manteiga e a amostra V passaram-se cinco meses e os pacotes de manteiga foram adquiridos no dia da primeira análise.

Observando os resultados da tabela 7 verifica-se que as respostas são exactamente iguais, não sendo necessário recorrer a testes estatísticos para verificar a boa reprodutibilidade do sistema fibra/sensor.

9.2.2 Sensibilidade do sistema fibra/sensor

Para estudar a sensibilidade do sistema fibra/sensor, colocou-se a fibra a adsorver no espaço de cabeça do porta-amostras com soluções de diferentes concentrações de cada um dos compostos, preparadas em metanol, que não dá qualquer resposta no sensor. Após adsorção por parte da fibra colocou-se a mesma a desorver no forno do sistema com o sensor de massa. Na figura 64 podem ver-se as rectas de calibração que serviram para calcular a sensibilidade do sistema fibra/sensor a cada um dos compostos e que se apresenta na tabela 8.

Nestas experiências utilizou-se um cristal piezoeléctrico revestido com ditiol em ambas as faces tendo sido de 13,9 kHz o decréscimo na frequência devido ao revestimento.

Tabela 8- Respostas do sistema fibra/sensor a diferentes compostos

Padrões	Sensibilidade (Hz.mol⁻¹.L)
2-propanona	2,78 ± 0,07
2-butanona	3,08 ± 0,09
2-pentanona	3,847 ± 0,003
2-heptanona	4,2033 ± 0,0001
3-hidroxi-2-butanona	1,3217 ± 0,0004
1-hexanol	2,260 ± 0,004
2-nonanona	3,5 ± 0,1
ácido acético	1,138 ± 0,002
2-undecanona	3,22 ± 0,07
ácido propanóico	1,790 ± 0,003
ácido butanóico	2,54 ± 0,08
ácido pentanóico	2,347 ± 0,009
ácido hexanóico	2,257 ± 0,002

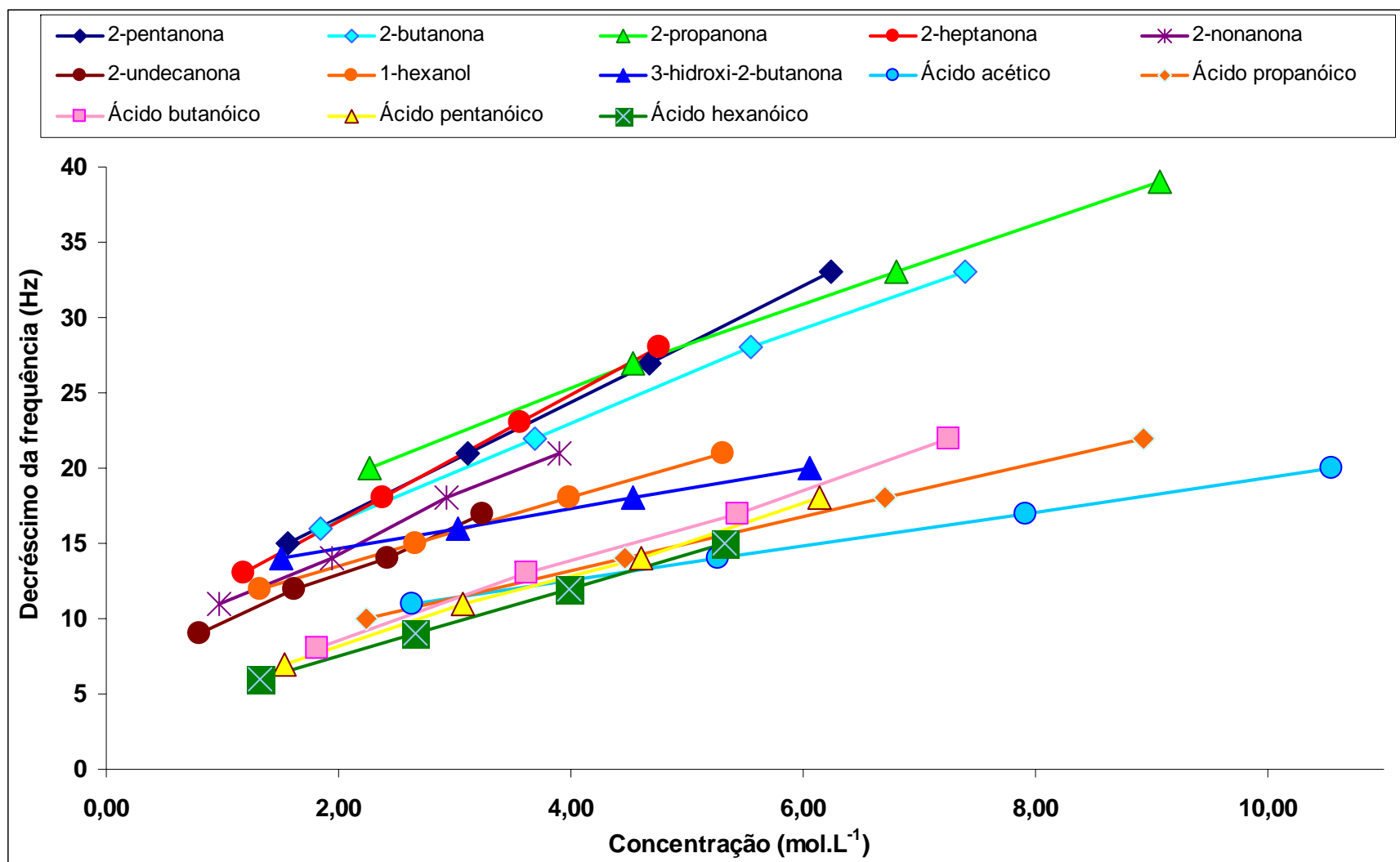


Figura 64 – Representação gráfica das rectas de calibração obtidas com o sistema fibra/sensor.

9.3. Análise sensorial

Com base na avaliação sensorial efectuada pelas seis pessoas seleccionadas, construíse a tabela 9 de forma a sistematizar os resultados.

Tabela 9- Avaliação sensorial da manteiga realizada por seis pessoas ao longo de um período de 46 dias.

Tempo (h)	Apreciação Sensorial
0	Cheiro normal a manteiga (6 pessoas)
29	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
53	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
78	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
102	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
126	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
150	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
174	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
198	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
222	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
246	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
270	Cheiro normal a manteiga aquecida (6 pessoas)
294	Cheiro azedo (4 pessoas) Cheiro a queijo (2 pessoas)
318	Cheiro azedo (4 pessoas) Cheiro a queijo (2 pessoas)
342	Cheiro azedo (4 pessoas) Cheiro a queijo (2 pessoas)
366	Cheiro a queijo (4 pessoa) Cheiro a ranço (2 pessoas)
390	Cheiro azedo intenso (3 pessoas) Cheiro a queijo (1 pessoa) Cheiro a ranço (2 pessoas)
414	Cheiro azedo intenso (3 pessoas) Cheiro a queijo (1 pessoa) Cheiro a ranço (2 pessoas)
438	Cheiro azedo intenso (3 pessoas) Cheiro a queijo (1 pessoa) Cheiro a ranço (2 pessoas)

462	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
486	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
510	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
534	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
558	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
582	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
606	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
630	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
654	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
678	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
702	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
726	Cheiro a queijo (2 pessoas) Cheiro a ranço (4 pessoas)
750	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas) Cheiro a ranço (3 pessoas)
774	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas) Cheiro a ranço (3 pessoas)
798	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas) Cheiro a ranço (3 pessoas)
822	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas) Cheiro a ranço (3 pessoas)
846	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas)

	Cheiro a ranço (3 pessoas)
870	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas) Cheiro a ranço (3 pessoas)
894	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas) Cheiro a ranço (3 pessoas)
918	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas) Cheiro a ranço (3 pessoas)
942	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas) Cheiro a ranço (3 pessoas)
966	Cheiro a queijo curado ou manteiga aquecida com um leve picante (3 pessoas) Cheiro a ranço (3 pessoas)
990	Cheiro azedo (4 pessoas) Cheiro a ranço (2 pessoas)
1014	Cheiro a azedo (6 pessoas)
1038	Cheiro a azedo (6 pessoas)
1062	Cheiro a azedo (6 pessoas)
1086	Cheiro a azedo (6 pessoas)
1110	Cheiro a azedo (6 pessoas)

É necessário realçar que as pessoas que efectuaram esta avaliação sensorial não tinham qualquer experiência a este nível, ou seja não são especialistas na área, tendo sido esta a primeira vez que realizaram este tipo de teste sensorial.

As pessoas que integraram o painel de avaliação manifestaram dificuldade em descrever o cheiro e principalmente em dizerem se o cheiro já era ou não a ranço por a manteiga se encontrar aquecida.

9.4. Discussão dos Resultados

A figura 65 mostra os resultados obtidos com o sensor e alguns dos cromatogramas em diferentes fases do processo da degradação da manteiga.

Verifica-se que ambos os métodos detectam os principais compostos responsáveis pela degradação da manteiga.

No entanto para melhor poder comparar a que compostos é mais sensível cada uma das metodologias, elaborou-se uma tabela de comparação, tabela 10, na qual os compostos estão ordenados pela sensibilidade.

Tabela 10- Comparação da sensibilidade dos principais compostos presentes na manteiga, no sistema fibra/sensor e no sistema fibra/GC/MS.

Composto	Ordem da sensibilidade no sistema fibra/sensor	Ordem da sensibilidade no sistema fibra/GC/MS
2-propanona	6.º	8.º
2-butanona	5.º	7.º
2-pentanona	2.º	6.º
2-heptanona	1.º	1.º
3-hidroxi-2-butanona	12.º	9.º
1-hexanol	9.º	5.º
2-nonanona	3.º	2.º
Ácido acético	13.º	11.º
Ácido propanóico	11.º	10.º
2-undecanona	4.º	3.º
Ácido butanóico	7.º	3.º
Ácido pentanóico	8.º	12.º
Ácido hexanóico	10.º	13.º

Para ajudar a comparar os resultados das três metodologias, fibra/GC/MS, fibra/sensor e método sensorial apresentam-se na figura 66 a soma das áreas dos picos de todos os compostos relevantes detectados por GC/MS, as respostas do sensor e alguns dos pontos mais significativos, aqueles em que se detectaram alterações, obtidos pelo painel constituído por seis voluntários.

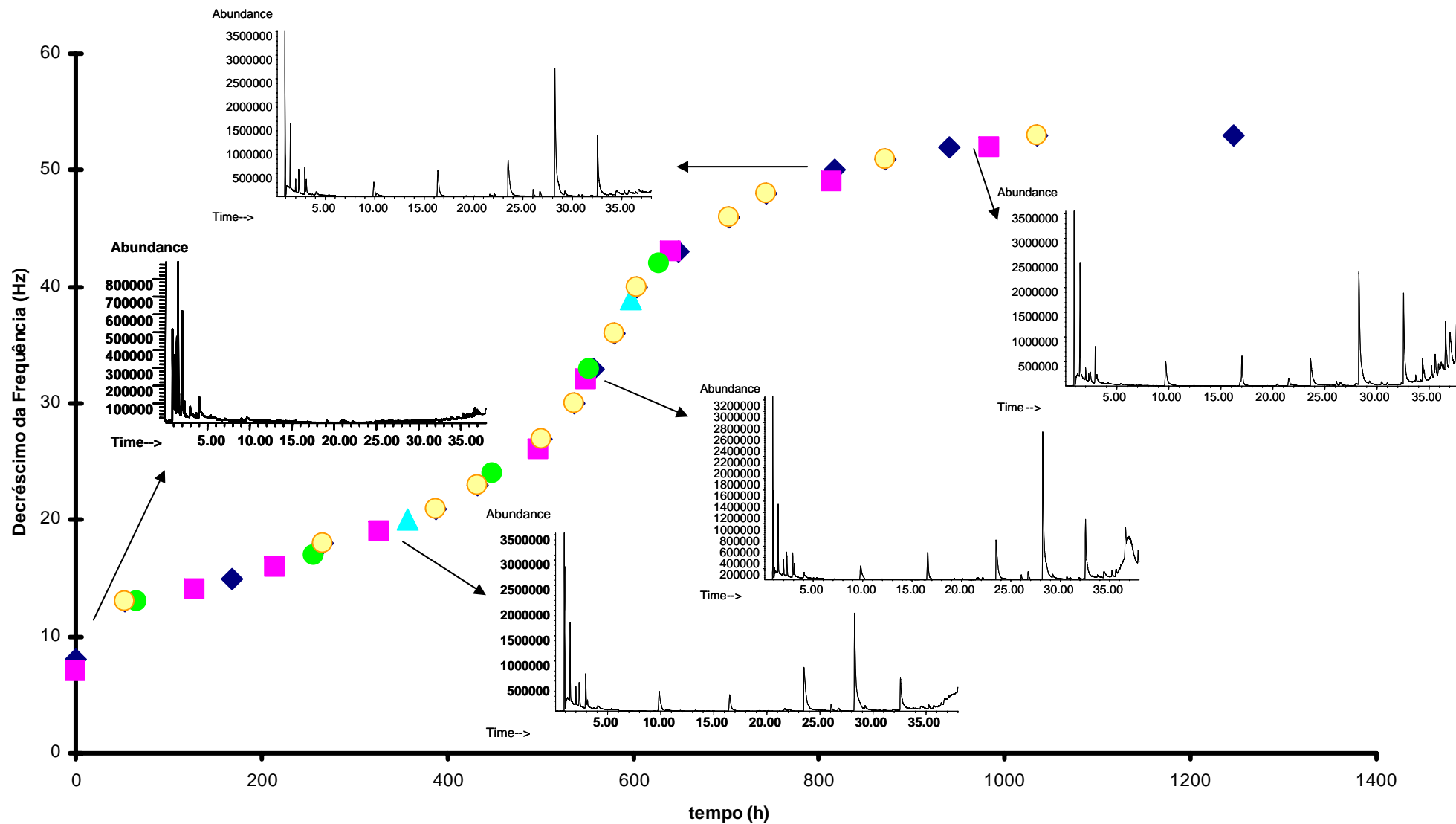


Figura 65 – Resultados obtidos com o sensor e alguns cromatogramas em diferentes fases do processo da degradação da manteiga.

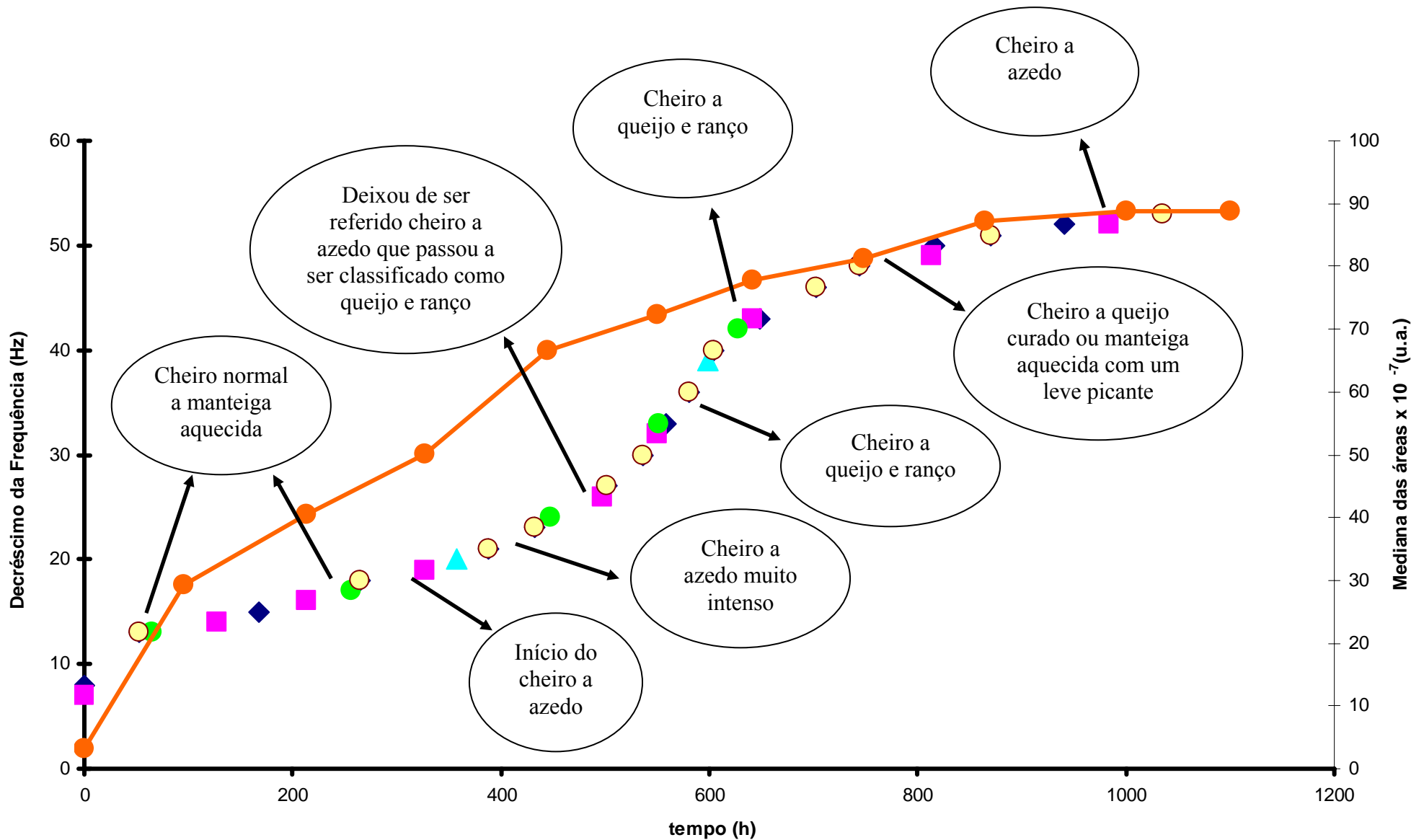


Figura 66 – Resultados sobrepostos das respostas do sensor com a soma das medianas das áreas dos picos cromatográficos bem como os pontos de alteração do cheiro.

Seguidamente listam-se as principais conclusões:

- 1) Tanto o sistema fibra/sensor como o sistema fibra/GC/MS respondem a todos os 13 compostos introduzidos como padrões e que se libertaram da manteiga.
 - a) O sistema fibra/sensor responde com maior sensibilidade às metilcetonas e com menor sensibilidade aos ácidos gordos.
 - b) O sistema fibra/GC/MS tem maior sensibilidade para a 2-nonanona e 2-heptanona, que se destacam dos restantes compostos.

2) Comparando a resposta do sensor com a soma das áreas dos picos cromatográficos notam-se diferenças consideráveis. Este facto é facilmente compreendido pela diferente sensibilidade que cada uma destas metodologias apresenta para os compostos que se desprendem da manteiga. De seguida analisam-se as respostas à luz das sensibilidades de cada uma das metodologias.

2.1- Tanto o sistema fibra/GC/MS como o sistema fibra/sensor apresentam maior sensibilidade para a 2-heptanona, que nos parece ser um bom marcador para seguir a degradação da manteiga, aproximadamente até às 500 horas, sendo pouco significativa a evolução deste composto para tempos mais longos.

2.2- O segundo composto para o qual o sistema fibra/GC/MS apresenta maior sensibilidade é a 2-nonanona, que é o terceiro em termos de sensibilidade para o sistema fibra/sensor e não parece ser um composto que seja o melhor modelo para seguir a degradação da manteiga ou para detectar o ranço, dado que é detectado na manteiga em muito pequena quantidade.

2.3- Em terceiro lugar, em termos de sensibilidade no sistema fibra/GC/MS vêm a 2-undecanona e o ácido butanóico, que aparecem respectivamente em quarto e em sétimo

lugar no sistema fibra/sensor. Como já foi dito, o sistema fibra/sensor apresenta sensibilidade elevada para as cetonas, embora as respostas para a 2-undecanona sejam inferiores às das restantes cetonas. Os níveis da 2-undecanona são no entanto muito baixos para se considerar um marcador para o ranço. A concentração do ácido butanóico sobe apreciavelmente durante os primeiros dias sendo o GC/MS capaz de o detectar muito mais facilmente do que o sensor. Na verdade, o sensor é pouco sensível a este composto e esta é a sua principal deficiência, notando-se contudo que existe uma variação significativa na resposta do sensor ao fim de 2 dias, sendo a variação nos 9 dias que se seguem muito lenta.

2.4- O sistema fibra/GC/MS detecta o 1-hexanol em quinto lugar, em termos de sensibilidade. O sensor só detecta este composto em nono lugar na tabela de sensibilidade, mas este está ainda no grupo dos compostos que dão respostas mais altas no sensor.

2.5- O sistema fibra/GC/MS detecta em sexto lugar, em termos de sensibilidade a 2-pentanona. A 2-pentanona é detectada pelo sistema fibra/GC/MS com uma ordem de sensibilidade muito semelhante à do 1-hexanol. Também a evolução da 2-pentanona é ao longo do tempo muito semelhante à do 1-hexanol, com excepção da resposta às 445 horas (18,5 dias). O sensor apresenta uma elevada sensibilidade a este composto.

2.6- O sistema fibra/GC/MS detecta a 2-butanona em sétimo lugar em termos de sensibilidade e o sensor em quinto lugar. Contudo este composto não parece ser muito importante para seguir a degradação da manteiga.

2.7- O sistema fibra/GC/MS responde à 2-propanona com uma sensibilidade mais baixa do que qualquer dos compostos citados anteriormente. Contudo, a 2-propanona liberta-se em concentrações apreciáveis podendo-se dizer que, em termos de abundância, é um dos compostos mais importantes que resultam da degradação da manteiga. O sensor é bastante

sensível a este composto (sexto em ordem de sensibilidade), mas um dos primeiros em grandeza das respostas na gama das concentrações dos padrões.

2.8- A 3-hidroxi-2-butanona, que é detectada com baixa sensibilidade pelo sistema fibra/GC/MS e com sensibilidade ainda mais baixa pelo sensor, é um composto que não regista grandes alterações nos cromatogramas, à excepção do período entre os 14 e 19 dias, onde tem uma subida muito acentuada.

2.9- Na cauda das sensibilidades, para o sistema fibra/GC/MS, aparecem os ácidos propanóico, acético, pentanóico e hexanóico. Como já foi referido o sistema fibra/sensor é pouco sensível aos ácidos gordos. Contudo, não se podem desprezar pela grandeza das suas áreas cromatográficas, os ácidos hexanóico e acético. Estes ácidos têm um incremento mais acentuado nos primeiros dias: o ácido acético até aos primeiros nove dias (214 horas) e o hexanóico durante os primeiros catorze dias (336 horas), aumentando no entanto, embora com menor velocidade, a sua abundância até aos 26,7 dias (641 horas).

2.10- Em conclusão pode dizer-se que o sensor detecta alterações na manteiga logo ao 2.º dia, mas apresenta nos dias seguintes uma variação muito gradual da sua frequência. O sistema fibra/GC/MS regista, nesta fase inicial, variações muito mais acentuadas, ditadas principalmente pelo aumento da concentração do ácido butanóico. O ácido acético e hexanóico também vão aumentando de concentração, apesar do painel só ter conseguido sentir o cheiro a azedo aos 294 dias. Apesar de se tratar de “não especialistas” não deixa de ser significativo o facto de ser unânime a classificação de “cheiro normal” até essa altura. No fundo pode dizer-se que a opinião do painel é mais coincidente com as respostas do sensor do que com a soma das áreas cromatográficas de todos os compostos. O painel só conseguiu detectar o cheiro a azedo, que pode ser proveniente dos ácidos, a partir das 294 horas (12 dias) que é coincidente com o início da fase de subida mais acentuada da resposta do sensor. Na verdade, o sensor consegue ao fim de dois dias, “notar” uma

pequena diferença em relação à manteiga fresca, mas tem uma subida abrupta após os 13,6 dias (327 horas). Esta subida abrupta pode estar relacionada com o final do período de indução da rancidez oxidativa e o início da segunda fase dos processos de oxidação, onde ocorre a aceleração do processo. A fase de subida mais rápida nas respostas do sensor inicia-se aproximadamente aos 21 dias (500 horas). Dois dias antes, o painel tinha deixado de classificar o cheiro como azedo, e passado a detectar um odor a queijo, que poderá estar relacionado com o facto de já não se notar uma evolução acentuada na quantidade dos ácidos e passar a ser mais importante o aumento na quantidade de cetonas que se desprendem da manteiga.

Uma vez que os compostos provenientes da degradação da manteiga são detectados com diferentes sensibilidades pelas duas metodologias experimentais (fibra/GC/MS e fibra/sensor), é natural que os perfis de ambos na Figura 66 sejam diferentes.

Nas experiências finais torna-se mais difícil relacionar o cheiro com os resultados experimentais porque, enquanto que nas experiências com o sensor os compostos detectados resultavam do acumular de voláteis desde o tempo zero, nas análises sensoriais o frasco era destapado para cada avaliação sensorial e os compostos detectados eram aqueles que volatilizavam entre duas avaliações.

10. Conclusão

A grande vantagem de um sensor deste género é a sua capacidade em traduzir por um único número o estágio de degradação da manteiga.

Os instrumentos mais dispendiosos e complexos como o GC/MS permitem discutir sobre os compostos que se estão a formar em cada estágio da manteiga, mas muito dificilmente se traduzirão numa “escala do ranço”, dado o grande número de compostos a analisar.

O sistema fibra/sensor é eficaz no seguimento da degradação da manteiga embora seja menos sensível nos estádios iniciais, onde a sua baixa sensibilidade ao ácido butanóico não permite que as alterações observadas sejam muito acentuadas.

Após o estágio inicial o ácido butanóico deixa de ser um bom marcador para seguir a degradação da manteiga, tornando-se mais importantes outros compostos como a 2-propanona, a 2-heptanona e a 2-pentanona, compostos para os quais o sensor apresenta maior sensibilidade.

A sensibilidade do sensor para seguir os estádios iniciais da degradação do sensor só poderá ser melhorada à custa de um aumento da sensibilidade do mesmo, por melhoramento do seu revestimento ou aumentando a quantidade de manteiga utilizada em cada análise.

Poder-se-ia ainda optar por adicionar ao sistema um segundo sensor, com maior sensibilidade para o ácido butanóico, apesar do aumento inicial da sua concentração não se traduzir num factor de desagrado por parte do painel de avaliação sensorial.

Contudo, o sistema fibra/sensor, tal como aqui é apresentado, com um único cristal, permite seguir a degradação da manteiga ao longo do tempo, e detectar, através das variações da frequência, os pontos onde os sinais analíticos apresentam alterações significativas na velocidade de subida com o tempo, que podem servir para detectar diferentes fases no processo de degradação, relacionadas com o desprendimento de famílias de compostos diferentes.

11. Referências bibliográficas

- [1] <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/butter.html>
- [2] Early R., *The technology of dairy products*, second edition, Blackie Academic & Professional: Cornwall, 1998.
- [3] Walstra P., Geurts T. J., Noomen A., Jellema A., Boekel M. A. J. S., *Dairy Technology Principles of Milk Properties and Processes*, Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999.
- [4] Halpern M. J., *Bioquímica*, Lidel - Edições Técnicas Lda.: Tipografia Lousanense, 1997.
- [5] Ballesteros E., Cardenas S., Gallego M., *Determination os Free Fatty-Acids in Dairy-Products by Direct Coupling of a Continuos Preconcentration Ion-Exchange-Derivatization Module To a Gas-Cromatograph*, Anal. Chem. 1984, 6: 628-634.
- [6] Ambrósio, C. L. B., Guerra N.B., Filho J.M., *Características de Identidade, Qualidade e Estabilidade da Manteiga de Garrafa*, Ciênc. Tecnol. Aliment. 2001, 21.
- [7].<http://www.wisdairy.com/otherDairyProductInfo/Butter/ButterBasics/CompositionOfButter.aspx>.
- [8] <http://food.oregonstate.edu>
- [9].<http://www.webexhibits.org/butter/off.html>
- [10] Allen J.C., Hamilton R.J., *Rancidity in Food*, Third Edition, Blackie Academic & Professional: Suffolk, 1994.
- [11] <http://www.ralstonanalytical.com>

[12] Heinio, R.L.; Lehtinen, P.; Oksman-Caldentey, M.; Poutanen, K. *Differences Between Sensory Profiles and Development of Rancidity During Long-Term Storage of native and Processed Oat*, Cereal Chem. 2002, 79:367-375.

[13] Belitz H.D., Grosch W., *Food Chemistry*, Second Edition, Springer: Berlin, 1999.

[14] Wheatley R. L., *Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation*, Trends Anal. Chem. 2000, 19, 617-623.

[15] Lean P.L., Mohamed S., *Antioxidative and antimycotic effects of turmeric, lemon grass, betel leaves, clove, black pepper leaves and Garcinia atriviridis on butter cakes*, J. Sci. Agric. 1999, 79:1817-1822.

[16] Amr A. S., *Effectiveness of Synthetic and Potencial Natural Antioxidants in Improving the Stability Of Sheep's Anhydrous Butter Fat Long-term Storage*, J. Sci. Agric. 1991, 55, 75-85.

[17] Contarini G., Povolo M., *Volatile Compound of Butter*, the Reporter, Supelco: Bellefonte, 2002, 4, 20.

[18] Sigma-Aldrich, *Flavors & Fragrances Featuring Naturals and Essential Oils*, International edition, Sigma-Aldrich, Inc., 2001-2002.

[19] <http://www.britanniafood.com/english/tc08.htm>

[20] <http://www.flavornet.org/info/111-27-3.html>

[21] Lewis R. J., Sr., *Condensed Chemical Dictionary*, twelfth edition, Van Nostrand Reinhold: New York, 1992.

[22] Budavan, S.O.M.J., Smith A., Heckelmen P.E., *The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, drugs and Biologicals*, eleventh edition, Merck & CO., Inc.: Rahway, 1989.

[23] <http://www.embrapa.html>

[24] Gomes, M. T. S. R. *Desenvolvimento de Sensores Baseados em Microbalanças de Cristais Piezoelétricos para a Determinação de CO₂ e SO₂*, Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, 1996.

[25] Redwood, M., *Piezoelectric devices in electronics*, Phys. Educ. 1980, 15, 9-14.

[26] Gomes M.T.S.R., *Is a quartz crystal microbalance really a mass sensor?* em Current Topics in Analytical Chemistry, editorial Advisory Board Berthod, A., Christian, G.D., Fang Z., Hillenkamp, F., Hullanicki, A., Hurtubise, R. J., Ingle Jr.J.D., Purgor, E., Smyth, M.R., Wang J., Wineforder J.D., Research Trends Trivandom 2001, vol.2, pág 187-193.

[27] Gomes M.T.R.S., *Bulk Acoustic Wave Sensors in Chemical Analysis em Smart Sensors and MEMS*, editado por Sergey Y. Yurish e Maria Teresa Gomes, Kluwer Academic Publishers, Dordrech 2004, pág. 421-445.

[28] Buchanan, R.C., *Ceramics Materials for Electronics-Processing, properties and applications*, second edition, Marcel Dekker Inc.:New York, 1983.

[29] Jaffe, B., Cook, W.R.Jr., Jaffe H., *Piezoelectric Ceramics*, ed. Roberts, J.P.,Popper, P., Academic Press: London, 1971.

[30] Yang M., Yau H.C.M., Zhu W. *Responses of a thickness-shear mode quartz resonator upon hydrogel formation*, Anal. Chim. Acta 1997, 351:177-187.

[31] Ho, M.H., *Aplications of piezoelectric quartz crystal microbalances*, ed. Lu, C., Czanderna, A.W., Elsevier, Amsterdan 1984, cap.10.

[32] Cattrall, R.W., *Chemical Sensors*, Oxford University Press Inc.: New York, 1997.

[33] Janata, J., *Principles of Chemical Sensors*, Plenum Press: New York, 1990.

[34] Guo, L. H., Facci, J. F., McLendon, G., *Effect of Gold Topography and Surface Pretreatment on the Self-Assembly of Alkanethiol Monolayers*, Langmuir 1994, 10, 4588-4593.

[35] Abrantes, L.M., Kalaji, M., Viana, A.S., *Eléctrodos Modificados por Monocamadas Auto-Montadas*, Química 1999, 74, 16-20.

[36] Sigma-Aldrich, *Micro-Extracção em Fase Sólida (SPME)*, Supelco: Bellefonte, 1999.

[37] Bard A.J., Rubinstein I., *Electroanalytical Chemistry: A series of advances*, 19, Marcel Dekker Inc.: New York, 1996.

[38] Creager S.E., Hockett L. A., Rowe G. K., *Consequences of microscopic surface roughness for molecular self-assembly*, Electroanalytical Chemistry, Langmuir, 1992, 8, 854-861.

[39] Kondo T., Takechi M., Sato Y., Ousaki K., *Adsorption behaviour of functionalized ferrocenyalkane thiols and disulfide onto Au and ITO and electrochemical properties of modified electrodes: effects of acyl and alkyl groups attached to the ferrocene ring*, J. Electroanal. Chem. 1995, 381, 203-209.

[40] Lavrich D.J., L. Waterer S.M., Facci, J. F., Bernasek, S.L., *Physisorption and Chemisorption of Alkanethiols and Alkyl Sulfides on Au(111)*, J. Phys. Chem. 1998, 102, 3456-3465.

[41] Creager S.E., Hockett L. A., Rowe G. K., *Consequences of Microscopic Surface Roughness for Molecular Self-Assembly of Alkanethiol Monolayers*, Langmuir 1994, 10, 4588-4593.

[42] <http://www.jandw.com>

[43] Skoog, A.S., West D.M., Holler F.J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition, Saunders College Publishing: Orland, 1996.

[44] Kitson G.F., Larsen B.S., McEwen C.N., *Gas Chromatography and Mass Spectrometry A Practical Guide*, Academic Press: London, 1996.

[45] Karasek, F.W., Clement R.E., *Basic Gas Chromatography - Mass Spectrometry principles and techniques*, Elsevier: Amsterdam, 1991.

[46] <http://www.shsu.edu/~chemistry/primers/gcms.html>.

[47] Pawliszyn J., *Theory of Solid-Phase Microextraction*, J. Chromatogr. Sci. 2000, 38, 270-278.

[48] Pawliszyn J., *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*, Wiley VCH, Inc.: New York, 1997.

[49] Sigma –Aldrich, *Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions*, Supelco: Bellefonte, Bulletin 923, 1996, 1-7.

[50] Shirey R. S., Mindrup R. F., *A Systematic Approach for Selecting the Appropriate SPME Fiber*, Supelco: Bellefonte, 1999.

[51] Llompart, K. Li, Fingas M., *Solid-Phase Microextraction and Headspace Solid-Phase Microextraction for the Determination of Polychlorinated Biphenyls in Water Samples*, Anal. Chem. 1998, 70, 2510-2515.

[52] March J., Smith M. B., *March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms, and Structure*, fifth edition, Wiley Interscience: New York, 1850-1851, 2001.