



**Susana Patrícia Alegria de Jesus**

Licenciatura em Engenharia Química e Bioquímica

**Estratégias de redução e mitigação da acrilamida  
em produtos de panificação**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador (a): Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira,  
Investigadora Principal, Departamento de Alimentação e  
Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Co-orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Maria Martelo Ramos,  
Professora Associada, Departamento de Química da  
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade  
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio, FCT-UNL  
Arguente: Prof. Doutor Carlos Fernando Santiago Neto Brandão, ESHTe  
Vogal: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, DAN-INSA

## Estratégias de redução e mitigação da acrilamida em produtos de panificação

**Susana Patrícia Alegria de Jesus**

Licenciatura em Engenharia Química e Bioquímica

**Estratégias de redução e mitigação da acrilamida  
em produtos de panificação**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador (a): Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira,  
Investigadora Principal, Departamento de Alimentação e  
Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Co-orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Maria Martelo Ramos,  
Professora Associada, Departamento de Química da  
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade  
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio, FCT-UNL  
Arguente: Prof. Doutor Carlos Fernando Santiago Neto Brandão, ESHTe  
Vogal: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, DAN-INSA



## **Direitos de cópia**

Estratégias de redução e mitigação da acrilamida em produtos de panificação

Copyright © 2016 – Susana Patrícia Alegria de Jesus- Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Todos os excertos e imagens retirados de diversos artigos, presentes ao longo desta dissertação são reproduzidos sob a permissão dos editores originais e sujeitos às restrições de cópia impostos pelos mesmos. A restante dissertação aplica-se a indicação de direitos de autor em nome de Susana Patrícia Alegria de Jesus, FCT/UNL e UNL.



## Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças ao contributo de diferentes pessoas que, direta ou indiretamente, estiveram presentes e me ajudaram a ultrapassar as dificuldades sentidas.

Muito especialmente, à Doutora Isabel Castanheira, do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (DAN-INSA), expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicional que muito elevaram os meus conhecimentos científicos, pela partilha do saber, às valiosas contribuições para o trabalho, a paciência e dedicação. Um muito obrigada.

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Maria Martelo Ramos, do Departamento de Química, pelo apoio e orientação disponibilizada na realização deste trabalho, conselhos e sugestões, além das palavras de ânimo transmitidas ao longo de todo o trabalho.

À Engenheira Inês Delgado, bolsista do Departamento de Alimentação e Nutrição, do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, um muito obrigada pela amizade, companheirismo e ajuda que permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação.

À Engenheira Andreia Rego, bolsista do Departamento de Alimentação e Nutrição, do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, um muito obrigada por todo o carinho, amizade e apoio nos momentos de maior aflição.

À Dra. Catarina André um muito obrigada pelo apoio e amizade.

Daniela, muito obrigada pelas conversas, risadas, ajuda e companheirismo.

Ao Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, manifesto apreço pela possibilidade de realização do presente trabalho e por todos os meios colocados à disposição.

Ao Ricardo, pelo amor, apoio e tranquilidade emocional que me deu alento e força para chegar a bom porto.

Por último, tendo consciência que sozinha nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento especial aos meus pais pelo seu amor incondicional, pelas palavras sábias que me facultaram a energia para seguir em frente... Um enorme obrigada por acreditarem em mim.

A todos que me ajudaram a ser quem sou, que depositaram confiança em mim e para os quais sou uma esperança, resta-me afincadamente não vos desiludir. Muito Obrigada.



## Resumo

A acrilamida (AA) é um contaminante cancerígeno para animais e provavelmente para humanos. Este é formado em alimentos, normalmente através da reação entre a asparagina e açúcares redutores, sendo as batatas fritas, o pão e o café os alimentos que contêm maior teor deste contaminante.

O principal objetivo deste trabalho consistiu no estudo de ocorrência em alimentos de pastelaria e panificação Portugueses, bem como, a redução deste contaminante em produtos de panificação.

Para a detecção e quantificação da acrilamida foi utilizado a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a um espectrómetro de massa (UPLC-MS).

Foi avaliada a ocorrência de acrilamida em 41 amostras de pastelaria e panificação. A torta de coco, a trouxa filo e o pão de azeitonas foram as amostras que apresentaram os teores mais elevados de acrilamida. Pelo contrário, as bolachas de caramelo, as de cacau e a baguete contêm os valores mais baixos.

Quanto às estratégias de redução elaboradas, as maiores taxas de redução obtiveram-se nos ensaios de base B, com valores entre 50 a 79%. Os resultados obtidos poderão ter repercussão na exposição da população à acrilamida porque vão permitir produzir alimentos com teores mais baixos de acrilamida.

**Palavras-chave:** Acrilamida, UPLC-MS, ocorrência, estratégias de redução



## Abstract

Acrylamide (AA) is a cancerous contaminant for animals and probably for humans. It is formed in foods, typically through the reaction between asparagine and reducing sugars, being french fries, bread and coffee the foods which contain a higher content of this contaminant.

The main objective of this study was the occurrence in baking food and Portuguese pastry, as well as the reduction of this contaminant in bakery products.

For detection and quantification of acrylamide the ultra-efficiency liquid chromatography coupled to a mass detector (UPLC-MS) was used.

The occurrence of acrylamide in 41 pastry and baking samples were evaluated. The coconut pie, backpack filo and olives bread were the samples with the highest levels of acrylamide. On the other hand, the caramel biscuits, cocoa and the baguette contain the lowest values.

As for the elaborate reduction strategies, the highest reduction rates are obtained for the based set B, with values between 50-79%. These results may have repercussions on the population exposure to acrylamide because it will allow food production to lower acrylamide levels.

**Keywords:** Acrylamide, UPLC-MS, occurrence, reduction strategies



## Índice de Matérias

Direitos de cópia .....	III
Agradecimentos .....	V
Resumo .....	VII
Abstract .....	IX
Índice de Matérias .....	XI
Índice de Tabelas .....	XIII
Índice de Figuras .....	XV
Lista de abreviaturas e Símbolos .....	XVII
Comunicações apresentadas em congressos .....	XIX
1. Objetivo .....	1
2. Introdução .....	3
2.1 Acrilamida .....	3
2.1.1 A segurança alimentar e a descoberta da acrilamida .....	3
2.1.2 Toxicidade e metabolismo da acrilamida .....	4
2.1.3 Formação de acrilamida em alimentos .....	5
2.1.4 Dados de ocorrência da acrilamida em alimentos processados .....	7
2.1.5 Estratégias de redução .....	10
2.1.6 Revisão dos métodos analíticos .....	12
2.2 Extração em fase sólida: SPE .....	13
2.3 Métodos cromatográficos .....	14
2.3.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência .....	14
2.3.2 Colunas cromatográficas .....	15
2.3.3 Detetores .....	15
2.4 Controlo da qualidade .....	16
3. Materiais e métodos .....	17
3.1 Amostras .....	17
3.2 Reagentes e Padrões .....	17
3.3 Instrumentação .....	17
3.4 Análise da acrilamida .....	18
3.4.1 Extração e purificação .....	18
3.5 Identificação e caracterização da acrilamida por UPLC-MS .....	18
3.6 Controlo da qualidade .....	19
3.7 Análise Estatística .....	19
4. Apresentação e Discussão de Resultados .....	21
4.1 Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas .....	21
4.2 Ocorrência de acrilamida em produtos de pastelaria e panificação .....	24
4.2.1 Produtos de Pastelaria .....	25

4.2.2	Produtos de panificação .....	29
4.3	Estratégias de redução .....	34
4.3.1	Adição de ingredientes e aditivos .....	34
4.3.2	Tempo de fermentação.....	41
5.	Conclusões e Proposta para trabalho futuro .....	45
5.1	Proposta para trabalhos futuros.....	46
6.	Bibliografia .....	47
7.	Anexos .....	55
	Anexo A – Identificação das amostras de ocorrência .....	55
	Anexo B – Análise de variância do estudo de ocorrência .....	57
	Anexo C – Análise de variância das Estratégias de redução .....	71

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Teor de AA em diferentes grupos de alimentos processados (adaptado de [27])	7
Tabela 2.2 Valores indicativos da EFSA para o teor de AA em alimentos (adaptado de [29])	8
Tabela 2.3. Caracterização dos mecanismos de partição [73]	13
Tabela 3.1. Parâmetros instrumentais e condições operacionais do sistema UPLC-MS	19
Tabela 4.1 Parâmetros instrumentais e condições operacionais do sistema UPLC-PDA	21
Tabela 4.2 Parâmetros otimizados do MS	22
Tabela 4.3 Parâmetros instrumentais e condições operacionais do sistema UPLC-MS	23
Tabela 4.4 Características analíticas para a determinação da acrilamida	23
Tabela 4.5 Resultado do teor de acrilamida nas amostras de queque	25
Tabela 4.6 Resultado do teor de acrilamida nas amostras de bolachas	26
Tabela 4.7 Resultado do teor de acrilamida nas amostras de Pastéis	27
Tabela 4.8 Resultado do teor de acrilamida nas Outras amostras	28
Tabela 4.9 Resultados do teor de acrilamida nas amostras de panificação	29
Tabela 4.10 Resultados do teor de AA nas amostras do produto de pastelaria	32
Tabela 4.11 Resultado geral de ocorrência de acrilamida	33
Tabela 4.12 Resultados do teor de acrilamida em produtos com base A	35
Tabela 4.13 Coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre as diferentes quantidades de aditivo (g) e o teor de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	37
Tabela 4.14 Resultados do teor de acrilamida no produto com base B	38
Tabela 4.15 Coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre as diferentes quantidades de aditivo (g) e o teor de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	40
Tabela 4.16 Resultados do teor de AA no produto com base A com diferentes tempos de fermentação	41
Tabela 4.17 Coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre o tempo de fermentação (minutos) e o teor de AA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	42
Tabela 4.18 Coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre o tempo de fermentação 40 a 80 minutos e o teor de AA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	42
Tabela A. 1 Identificação das amostras de pastelaria	55
Tabela A. 2 Identificação das amostras de panificação	56
Tabela B. 1 ANOVA para a determinação de AA realizadas às amostras de pastelaria	57
Tabela B. 2 Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD	58
Tabela B. 3 ANOVA para a determinação de AA realizadas às amostras de pão	63
Tabela B. 4 Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD	63
Tabela B. 5 ANOVA para a determinação de AA realizadas às amostras do produto de pastelaria	66
Tabela B. 6 Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD	66

Tabela C. 1 ANOVA para a determinação de AA realizadas às amostras de produto A e B.....	71
Tabela C. 2 Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD.....	72

## Índice de Figuras

Figura 2.1 Estrutura da acrilamida (adaptado de [2]).	3
Figura 2.2 Mecanismo de formação da via dos lípidos e da carnosina (adaptado de [24]).	5
Figura 2.3. Formação da acrilamida pela reação de Maillard (adaptado de [26]).	6
Figura 2.4 Consumo anual de alimentos em Portugal 2014-2015 (adaptado de [31]).	9
Figura 2.5 Imagem ilustrativa do método SPE.	14
Figura 2.6 Representação esquemática do espectrofotómetro de massas do DAN-INSA.	16
Figura 4.1 Cromatograma de acrilamida. (A) Padrão de acrilamida; (B) Amostra de pão de especiarias.	21
Figura 4.2 Transição 72>55 m/z.	22
Figura 4.3 Cromatograma da acrilamida.	23
Figura 4.4 Curva de calibração de acrilamida.	24
Figura 4.5 Comparação do teor de acrilamida nas bolachas e valores indicativos da EFSA.	27
Figura 4.6 Comparação dos dados obtidos das amostras de panificação e os valores indicativos para pão de trigo da EFSA [27].	30
Figura 4.7 Comparação dos dados obtidos das amostras de panificação e os valores indicativos para pão da EFSA [27].	31
Figura 4.8 Comparação dos dados obtidos das amostras do produto de pastelaria e os valores indicativos da EFSA [27].	32
Figura 4.9 Comparação dos resultados com a Farinha A e os valores indicativos da EFSA [27].	36
Figura 4.10 Gráfico de dispersão das amostras de mistura 2,3,4 e 5.	36
Figura 4.11 Comparação dos resultados com os valores indicativos da EFSA [27].	39
Figura 4.12 Gráfico de dispersão das amostras de mistura 2,3,4 e 5 da base B.	39
Figura 4.13 Comparação de resultados das misturas da farinha A e B.	40
Figura 4.14 Gráfico de dispersão do tempo de fermentação.	42
Figura B. 1 Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras de queques, bolachas e pastéis.	58
Figura B. 2 Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras Outras.	59
Figura B. 3 Verificação da independência para a determinação de acrilamida nas amostras de queques, bolachas e pastéis.	59
Figura B. 4 Verificação da independência para a determinação de acrilamida nas amostras Outras.	60
Figura B. 5 Verificação da homogeneidade da variância na determinação da acrilamida nas amostras de queques, bolachas e pastéis.	61
Figura B. 1 Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras de queques, bolachas e pastéis.	58

Figura B. 2 Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras Outras.....	59
Figura B. 3 Verificação da independência para a determinação de acrilamida nas amostras de queques, bolachas e pastéis.....	59
Figura B. 4 Verificação da independência para a determinação de acrilamida nas amostras Outras.....	60
Figura B. 5 Verificação da homogeneidade da variância na determinação da acrilamida nas amostras de queques, bolachas e pastéis.....	61
Figura B. 6 Verificação da homogeneidade da variância na determinação da acrilamida nas amostras Outras.....	61
Figura B. 7 Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras de pães.....	64
Figura B. 8 Verificação da independência para a determinação de acrilamida para as amostras de pães.....	64
Figura B. 9 Verificação da homogeneidade da variância na determinação de acrilamida nas amostras de pães.....	65
Figura B. 10 Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras do produto de pastelaria.....	67
Figura B. 11 Verificação da independência para a determinação de acrilamida para as amostras do produto de pastelaria.....	68
Figura B. 12 Verificação da homogeneidade da variância na determinação de acrilamida nas amostras do produto de pastelaria.....	68
Figura C. 1 Verificação da normalidade para a determinação de AA nas amostras de produto com base A e B.....	73
Figura C. 2 Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras de fermentação.....	73
Figura C. 3 Verificação da independência para a determinação de AA para as amostras de produto A e B.....	74
Figura C. 4 Verificação da independência para a determinação de AA para as amostras de Fermentação.....	74
Figura C. 5 Verificação da homogeneidade da variância na determinação de AA nas amostras de produto com base A e B.....	75
Figura C. 6 Verificação da homogeneidade na determinação de AA nas amostras de fermentação.....	75

## Lista de abreviaturas e Símbolos

- AA – Acrilamida
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- ANOVA – Análise de Variância
- APCI – Ionização química à pressão atmosférica
- APPI – Fotoionização à pressão atmosférica
- BCR – *Bureau Communautaire de reference*
- BEH – *Ethylene Bridged Hybrid*
- BMDL<sub>10</sub> – *Benchmark Dose Lower Confidence Limit*, Índice de limite de confiança da dose mais baixa
- COMAR – *Code d'Indexation des Matériaux de référence*
- DAN – Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA
- EFSA – *European Food Safety Authority*, Autoridade Europeia da Segurança Alimentar
- EPTIS – *European Proficiency Testing Information System*
- ESI – Ionização por electrospray
- FAPAS – *Food Analysis Performance Assessment Scheme*
- IARC – *International Agency for Research on Cancer*, Agência Internacional da Organização Mundial da Saúde para a Pesquisa sobre o Cancro
- INSA – Instituto de Saúde Doutor Ricardo Jorge
- INE – Instituto Nacional de Estatística
- LSD – Teste da menor diferença significativa
- MS – Espectrómetro de massa
- PDA – Detetor de Matriz de Fotodíodos
- SNFA – *SWEDISH National Food Administration*
- SPE – Extração em Fase Sólida
- TDS – *Total Diet Studies*, Estudos de dieta total
- UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
- WHO – *World Health Organization*, Organização Mundial de Saúde
- 3-APA – 3- aminopropionamida
- m/z – Proporção massa-carga
- °C – Graus Celsius
- R<sup>2</sup>- Coeficiente de Correlação
- ρ – Coeficiente de correlação de Spearman



## Comunicações apresentadas em congressos

Durante o trabalho realizado no período de estágio no Instituto de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), foi possível realizar as seguintes comunicações apresentadas em congressos:

- C. André, I. Delgado, S. Jesus, I. Castanheira. “Acrylamide determination in Portuguese food matrices by UPLC-PDA and UPLC-MS”. International Conference on food contaminants, Lisboa, Portugal (2015)
- C. André, I. Delgado, S. Jesus, A. Ramos, C. Brandão, N. Félix, I. Castanheira. “Contribution of metrology on determination of acrylamide in foodstuffs”. XXI IMEKO World Congress “Measurements in Research and Industry”, República Checa, Praga (2015)
- S. Jesus, I. Delgado, A. Ramos, C. Brandão, N. Félix, I. Castanheira. “Acrilamida em doçaria Portuguesa”. 8ª Reunião Anual PortFIR, Lisboa, Portugal (2015)
- S. Jesus, I. Delgado, A. Rego, I. Castanheira. “Occurrence of acrylamide in Portuguese bread”. 2<sup>nd</sup> IMEKOFOODS “Promoting Objective and Measurable Food Quality & Safety”, Benevento, Itália (2015)



## 1. Objetivo

A acrilamida (AA) é um contaminante, cancerígeno para animais e possivelmente para humanos, que se gera durante o processamento dos alimentos ricos em hidratos de carbono. Contudo, ainda são poucos os estudos de ocorrência deste contaminante em alimentos Portugueses. Tornando-se assim, importante o seu estudo na população Portuguesa.

Este trabalho teve, não só como principal objetivo estudar a ocorrência de acrilamida em pastelaria e panificação Portuguesa, como também possíveis estratégias de redução nos mesmos.

Nesse sentido, foi então realizada o desenvolvimento e otimização do método analítico para a determinação e quantificação do contaminante em estudo, utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). Com base no estudo de ocorrência, foram estudadas estratégias de redução no produto de panificação, através de adição de agentes redutores.

Foi ainda realizado o estudo da relação do tempo de fermentação com a formação de acrilamida durante o processamento do produto.

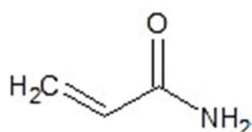
Uma vez que foi detetada a ausência de dados de ocorrência dos alimentos Portugueses na base de dados da Autoridade Europeia da Segurança Alimentar (EFSA), surgiu, como segundo objetivo, a seleção e formatação de dados para inserção na respetiva base de dados.



## 2. Introdução

### 2.1 Acrilamida

A acrilamida é uma amida derivada do ácido cítrico, tendo uma estrutura vinílica (Figura 2.1). Este contaminante é um sólido cristalino, não volátil e sem cor, dissolvendo-se em água, álcool e outros solventes polares. Porém, em ambientes ácidos ou alcalinos a acrilamida tende a hidrolisar e a formar ácido acrílico [1, 2].



**Figura 2.1** Estrutura da acrilamida (adaptado de [2]).

Esta substância foi sintetizada pela primeira vez no ano de 1949. Porém o início da sua produção a nível industrial ocorreu em 1950, através da hidratação do acetonitrilo, com um ácido ou catalisador de cobre sulfúrico [3].

Anos mais tarde, foi descoberta a enzima nitrilo hidratase que, ao entrar em contato com o acetonitrilo gera, a acrilamida [3].

A acrilamida é maioritariamente utilizada como intermediária na reação de poliacrilamida que, por sua vez, atua na purificação da água potável, água de esgotos, atuando como um agente de floculação. No entanto, este composto é ainda aplicado noutras indústrias como na do papel, do petróleo e dos têxteis [1, 3–5].

#### 2.1.1 A segurança alimentar e a descoberta da acrilamida

A preocupação do Homem quanto à segurança alimentar não é uma questão recente. Já no antigo Egipto e na Índia existiam leis para a prevenção da contaminação da carne e regulamentos que proibiam a adulteração da composição dos alimentos [6].

O conhecimento na área da segurança alimentar tem estado em constante evolução, sendo feitas novas descobertas a cada segundo. A World Food defeniu, em 1996, o conceito de segurança alimentar : “Food security exists when all people, at all times, have physical, social and economic access to sufficient, safe and nutritious food which meets their dietary needs and food preferences for an active and healthy life”, tornando-se, este, um dos conceitos mais citado e seguido pela Organização Mundial de Saúde (WHO) [7].

Os alimentos, antes de serem consumidos, estão sujeitos a diversas etapas tais como, a produção, o processamento, o empacotamento, e, por fim, a sua distribuição até ao consumidor

final [6]. É durante estas fases que podem ocorrer contaminações nos alimentos, como é o caso da acrilamida, a qual se forma durante o processamento [8].

A acrilamida já tinha sido identificada em cigarros, porém, apenas no ano de 2002 é que cientistas suecos da SNFA (SWEDISH National Food Administration) relataram a existência de acrilamida em alimentos processados [1, 9]. A acrilamida, tal como referido anteriormente, está presente em diversos grupos de alimentos, fazendo com que o ser humano esteja em permanente contacto com este contaminante, através da sua ingestão, inalação ou mesmo pela sua absorção tópica [10–12].

## 2.1.2 Toxicidade e metabolismo da acrilamida

No ano de 1994, a Agência Internacional da Organização Mundial da Saúde para a Pesquisa sobre o Cancro (IARC) classificou a acrilamida como uma substância carcinogénica para animais e, provavelmente, para humanos (grupo 2 A) [1].

Posteriormente, os estudos de toxicidade conduziram à sua classificação como substância neurotóxica, devido às afeções sobre o sistema nervoso periférico, sendo que, em casos de exposição a quantidades elevadas, esta pode provocar lesões sobre o sistema nervoso central [13], tais como a ataxia<sup>1</sup> e fraqueza muscular esquelética [14].

Devido ao metabolismo da acrilamida, esta é ainda considerada uma substância contaminante genotóxica uma vez que quando em contacto com o organismo, é facilmente absorvida e distribuída pelas células, desencadeando um processo de oxidação pelo citocromo P450 2E1<sup>2</sup>. A oxidação leva à transformação da acrilamida em glicidamida (agente genotóxico) que ao reagir com o ácido desoxirribonucleico (ADN), forma aductos de ADN [15–17].

Contudo, há que referir que a acrilamida não transformada é excretada pela urina [10, 15].

## Acrilamida, substância prioritária dos estudos de dieta total

A acrilamida foi considerada o oitavo contaminante com maior importância na lista das substâncias prioritárias do projeto TDS exposure [18], estando antecedida pelo arsénio inorgânico, cádmio e precedida por mercúrio inorgânico, entre outras [18]. Esta classificação conduziu à necessidade de se produzirem dados de ocorrência em cada um dos beneficiários do projeto. É neste contexto que foi elaborada a presente dissertação

---

<sup>1</sup> Transtorno neurológico caracterizado pela falta de coordenação de movimentos musculares voluntários e de equilíbrio.

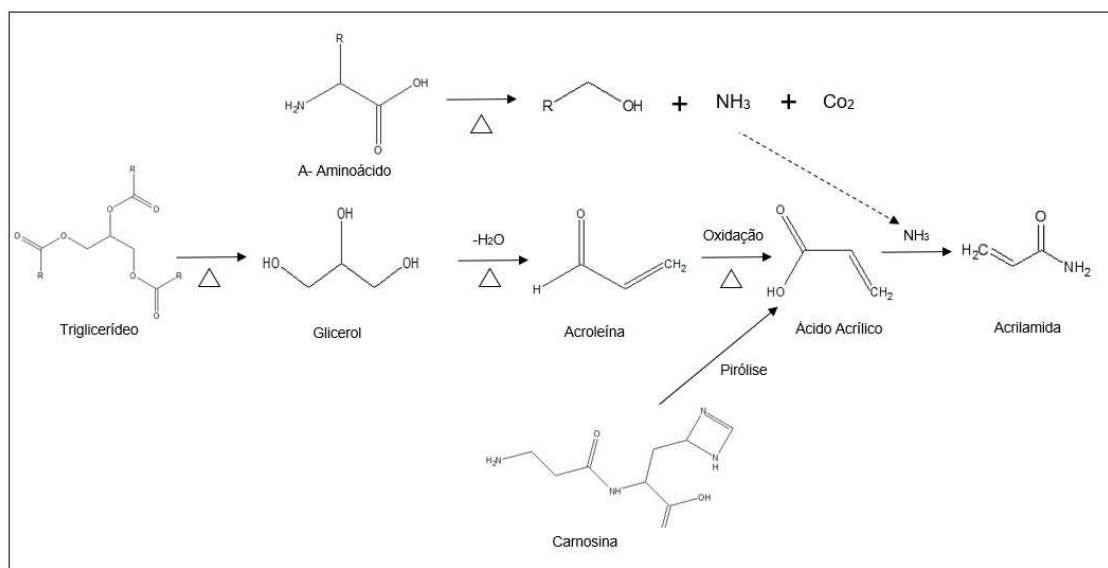
<sup>2</sup> Citocromo que pertence a um sistema oxidativo que está envolvido no metabolismo de substâncias estranhas ao organismo ou sistema biológico

Estudos de dieta total (TDS) são pesquisas nacionais com o objetivo de fornecer informação sobre a exposição alimentar crónica de uma determinada população aos contaminantes alimentares, permitindo, assim, avaliações de risco. Esta exposição é realizada em alimentos tal como consumidos, os quais são representativos da dieta da população em estudo.

### 2.1.3 Formação de acrilamida em alimentos

A acrilamida é um contaminante que pode ser formado por três reações diferentes e independentes: a reação de Maillard, a dos lípidos e da carnosina [18,22]. Todas estas reações dependem da composição nutricional dos alimentos.

A reação que ocorre através da via dos lípidos, Figura 2.2, é uma das reações químicas que ocorre durante o processamento dos alimentos e que pode ter impacto na qualidade do produto final. Em mais pormenor, através do aquecimento, os lípidos podem dar origem à acroleína, sendo que a oxidação desta origina ácido acrílico ou um radical acrílico intermediário. Ambos os produtos, na presença da amónia proveniente da decomposição dos aminoácidos, formam a acrilamida [24].

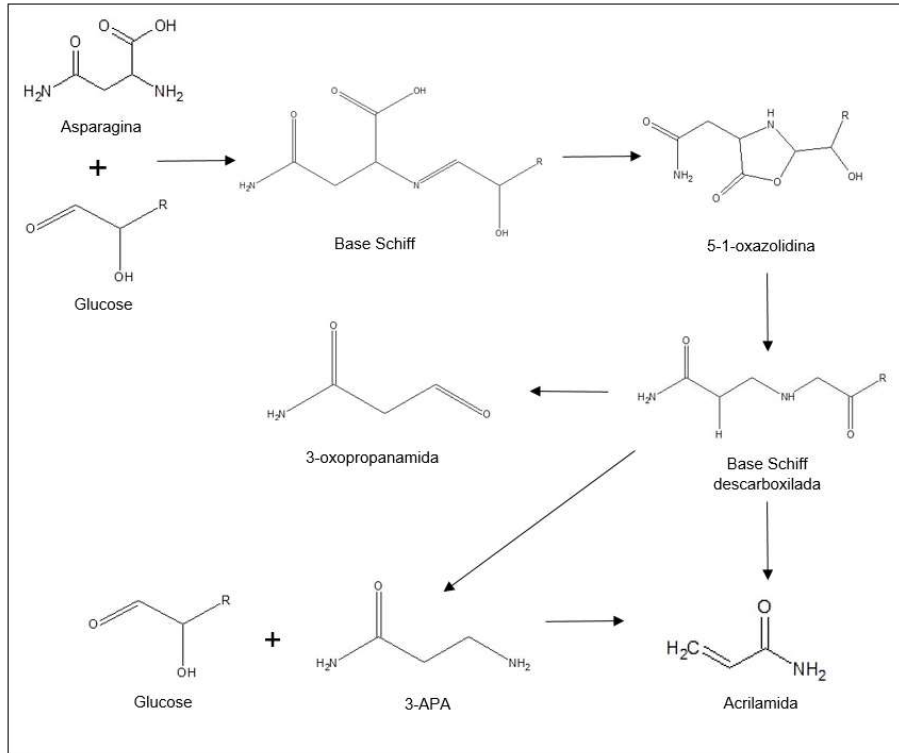


**Figura 2.2** Mecanismo de formação da via dos lípidos e da carnosina (adaptado de [24]).

Na outra via secundária, Figura 2.2, a reação de pirólise da carnosina gera ácido acrílico que, por sua vez, forma o contaminante em estudo na presença de amónia, como explicado anteriormente [12]. Esta reação só ocorre em determinados grupos de alimentos, como por exemplo na carne. No entanto, não é a via mais frequente.

A reação de Maillard, é a via principal da formação da acrilamida. Esta consiste na reação entre os precursores, asparagina e açúcares redutores, originando a base de Schiff que, ao sofrer descarboxilação, dá origem à 5-1-oxazolidina. Posteriormente, o produto descarboxilado

pode decompor-se e formar a acrilamida, por eliminação de uma amina, ou hidrolisar e formar 3-aminopropionamida (3-APA). Este composto, na presença de açúcar, dá origem à acrilamida. No entanto, o produto descarboxilado pode ainda gerar 3-oxopropanamida [25], como descrito na Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Formação da acrilamida pela reação de Maillard (adaptado de [26]).

O teor de acrilamida no produto final depende da concentração inicial dos precursores. Contudo, existem fatores que influenciam a reação de Maillard como, por exemplo, a temperatura e a duração do processamento. Estes fatores variam proporcionalmente com o aumento do contaminante, ou seja, um aumento da temperatura e duração gera um aumento da acrilamida. No entanto, quando comparados dois alimentos, um com teor mais elevado de água do que outro, o alimento com maior teor de acrilamida será o que tem um menor teor de água. Outro fator relevante é o pH, uma vez que a pH ácido é formada menos acrilamida durante o processamento do alimento [12].

## 2.1.4 Dados de ocorrência da acrilamida em alimentos processados

Os níveis de acrilamida ao qual as populações se encontram expostas são diferentes de país para país, devido à variabilidade existente nos hábitos alimentares de cada um.

Tornou-se, então, necessário a realização de estimativas de ocorrência de acrilamida, tendo vindo a ser efetuado em diversos países. Em Portugal estes estudos ainda não foram realizados. Como tal, não existem dados reportados à EFSA.

Na Tabela 2.1 encontram-se os valores de ocorrência de alguns grupos de alimentos processados [27].

**Tabela 2.1** Teor de AA em diferentes grupos de alimentos processados (adaptado de [27])

Grupo de produtos	Acrilamida (µg/kg)
Produtos de batatas <sup>a</sup>	303-313
Batatas fritas e snacks	388-389
Pão	36-49
Cereais de pequeno-almoço	157-164
Biscoitos, crackers	261-269
Café	521-523
Alimentos para bebés/crianças	17-31
Alimentos processados à base de cereais para crianças	70-76
Outros produtos baseados em batatas, cereais e cacau <sup>b</sup>	92-101
Outros produtos <sup>c</sup>	321-339

<sup>a</sup> exceto batatas fritas; <sup>b</sup> inclui produtos de pastelaria; <sup>c</sup> vegetais, azeitonas, entre outros

Apesar das diferenças alimentares, verifica-se a existência de semelhanças em alguns alimentos que contribuem para a exposição entre a Europa e o Norte da América [28].

Os alimentos que contêm acrilamida são produtos consumidos diariamente pela população. Foi apurado que os adultos estão mais expostos a este contaminante através da ingestão de géneros alimentícios, como as batatas fritas, café e pão, enquanto as crianças são expostas através de alimentos como os cereais de pequeno-almoço, bolachas, pão e batatas fritas [27].

Uma vez que a acrilamida é considerada cancerígena para animais e possivelmente para humanos, não foram ainda definidos pela EFSA os limites máximos toleráveis, havendo apenas valores indicativos para alguns grupos alimentares, como se pode observar na Tabela 2.2 [29]. Perante estes valores (Tabela 2.2), observa-se que para certos grupos de alimentos tais como os produtos de pastelaria e carne, não existem valores indicativos. Por este motivo e perante a toxicidade deste contaminante para a saúde, torna-se importante que sejam reavaliados os grupos nos quais a acrilamida é formada.

**Tabela 2.2** Valores indicativos da EFSA para o teor de AA em alimentos (adaptado de [29])

<b>Género Alimentício</b>	<b>Valor indicativo (µg/kg)</b>
Batatas fritas prontas a comer	600
Batatas fritas de pacote fabricadas com batatas frescas Snacks de batata fabricados com massa de batata Bolachas salgadas à base de batata	1000
Pão fresco	
a) Pão à base de trigo	80
b) Pão fresco excluindo pão à base de trigo	150
Cereais para pequeno-almoço (exceto papas de aveia)	
- Produtos à base de farelo e cereais integrais, grãos tufados pelo processo de gun puffing	400
- Produtos à base de trigo e de centeio	300
- Produtos à base de milho, aveia, espelta, cevada e arroz	200
- Bolachas e wafers	500
- Bolachas salgadas (crackers) com exceção de crackers à base de batata	500
- Pão denominado knäckebrot	450
- Pão-de-espécie (gingerbread)	1000
- Produtos semelhantes aos outros produtos desta categoria	500
Café torrado	450
Café instantâneo (solúvel)	900
Sucedâneos do café	
a) Sucedâneos do café, principalmente à base de cereais	2000
b) Outros sucedâneos do café	4000
Alimentos para bebés, exceto alimentos à base de cereais transformados	
a) Sem ameixas	50
b) Com ameixas	80
Bolachas e tostas para lactentes e crianças jovens	200
Alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças jovens, exceto bolachas e tostas	50

Apesar dos valores indicativos do teor de acrilamida atribuídos pela EFSA, esta considera que não é possível definir uma dose diária tolerável deste contaminante nos alimentos, tendo recorrido ao Índice de limite de confiança da dose mais baixa (BMDL<sub>10</sub>). Definindo, deste modo,

um valor de 0,17 mg/kg por peso corporal/dia para o caso de formação de tumores e de 0,43 mg/kg por peso corporal/dia para outros efeitos, como alterações neurológicas [27].

Com os vários estudos de ocorrência realizados [27], em particular nos países europeus, como por exemplo os Países Baixos e França, a exposição das populações a este contaminante tem vindo cada vez mais a ser uma questão importante na comunidade científica.

A EFSA realizou um estudo que abrangeu 17 países europeus, no qual constatou que a gama de valores da exposição média à acrilamida é entre 0,14 e 1,9 µg/kg por peso corporal [27].

Em Portugal, o único estudo de exposição existente foi baseado na população adulta (18 a 92 anos de idade) da cidade do Porto. Podendo afirmar-se que os resultados obtidos, 0,6-0,7 µg/kg por peso corporal [30], se encontram dentro da gama média de valores da exposição reportados pela EFSA [27].

## Grupos de alimentos consumidos em Portugal

Os cereais e seus derivados é o grupo de géneros alimentícios que se destaca pelo seu elevado consumo em Portugal, Figura 2.4, com base nos dados de 2014-2015, do Instituto Nacional de Estatística (INE) [31]. Sabe-se que este é um dos principais grupos responsáveis pela exposição da população à acrilamida, tornando-se deste modo, importante investigar a ocorrência deste contaminante nos produtos à base de cereais.

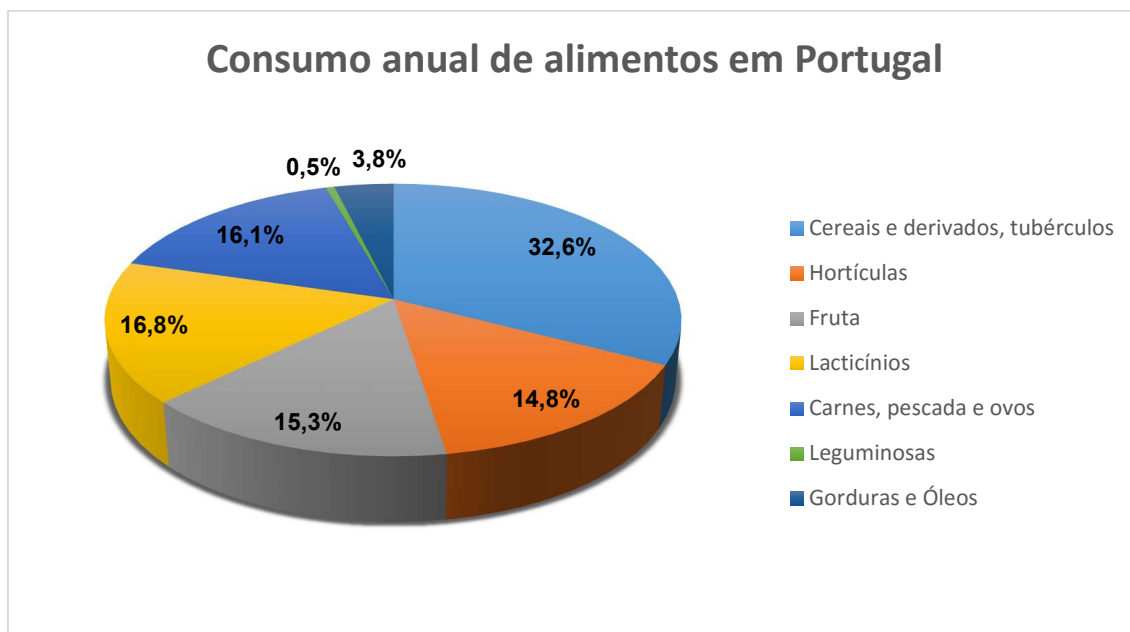


Figura 2.4 Consumo anual de alimentos em Portugal 2014-2015 (adaptado de [31])

## 2.1.5 Estratégias de redução

Devido à toxicidade da acrilamida, torna-se imprescindível desenvolver estratégias para sua redução, existindo alguns estudos com esse propósito [19–21, 32–39]. Pelo capítulo anterior, 2.1.3 – Formação de acrilamida em alimentos, pode concluir-se que existem várias estratégias, as quais se podem aplicar de forma a reduzir a acrilamida, ou até mesmo eliminá-la.

Perante a variedade de alimentos que contêm acrilamida, vários investigadores agruparam os mesmos segundo os seus produtos base, tendo sido criados três grupos principais: o grupo de produtos à base de batata, de cereais e de café [18,19].

Constatou-se que o principal precursor não é o mesmo nos diferentes grupos alimentícios, sendo fundamental ter este fato em consideração antes da aplicação de estratégias em alimentos [40]. Apesar dessas diferenças, existem estratégias semelhantes que se podem aplicar no grupo de produtos à base de batata e de cereais.

Na agricultura, a utilização de enxofre como fertilizante é benéfico para os cereais [41]. Porém, nas batatas é a privação deste, que possibilita uma menor formação de acrilamida no produto final [42]. Por outro lado, nas batatas, a aplicação de fertilizantes com azoto é favorável para a redução [41]. Existe ainda a hipótese de incorporar na etapa da confeção, vitaminas, glicina e antioxidantes [43, 40, 44, 45], ou até mesmo alterar a temperatura e tempo de processamento [46], em ambos os grupos.

### Produtos à base de batata

Neste grupo de alimentos, o precursor importante é a asparagina. Todavia, os açúcares redutores comportam-se como reagentes limitantes [47], ou seja, não existindo açúcares nos alimentos não ocorre formação de acrilamida.

Deste modo, na agricultura, é fundamental ter em atenção a seleção da variedade da batata, devendo ser selecionadas as variedades com baixo teor de açúcares redutores [40].

Como foi referido, a etapa de confeção de alimentos é uma das fases onde existe a possibilidade da aplicação de várias estratégias. Bråthen *et al* [43] incorporou aminoácidos, como a glicina ou a glutamina, adquirindo reduções na ordem de 30%. Por outro lado, Urbančič *et al* [48] misturou extrato de alecrim ao óleo de fritar, obtendo redução da formação de acrilamida. Pelo estudo realizado por Morales *et al* [49], constatou-se ainda que a realização de tratamentos nas batatas com extratos naturais de ácido ascórbico e chá verde possibilitam a diminuição do contaminante. Dado que o pH é um dos fatores importantes para a reação de Maillard, torna-se benéfico adicionar sais de cálcio, ácido cítrico, sais de vanádio, ácido acético, ou até mesmo um pré-tratamento com catiões bivalentes, uma vez que estes alteram o pH, baixando-o [40]. Mais recentemente, Koklamaz *et al* [50] descobriu que, a aplicação de radiofrequência de aquecimento após secagem reduzia a acrilamida formada.

## Produtos à base de cereais

Há semelhança das batatas, neste grupo é relevante escolher os produtos com menor teor de asparagina [40]. Existe ainda a hipótese de se utilizar uma mistura de farinhas, de trigo e grão-de-bico, a qual permite uma redução da acrilamida, que poderá ser resultado do efeito “protetor” da proteína da farinha de grão-de-bico [51].

No momento da confeção, Amrein *et al* [44] substituiu o fermento de bicarbonato de amónio por bicarbonato de sódio e estudou ainda a adição de glicina, verificando que ambas as estratégias diminuem o contaminante em estudo. Pode recorrer-se, também, a especiarias, como é o caso do alho, da pimenta branca, anis, erva-doce, noz-moscada, baunilha, cardamomo, entre outras [36].

A utilização das folhas de bambu é outra possibilidade, dado que estas possuem antioxidantes tais como os ácidos ferúlico, p-cumárico, cafeico e clorogénico [52], entre outros. Chen *et al* [45] averiguou que os polifenóis de chá, também reduzem a acrilamida. Quanto ao tempo de fermentação, fator determinante para a reação de Maillard, este permite que ocorra a eliminação de asparagina e açúcares redutores ao longo do tempo de fermentação, concluindo-se assim que, quanto maior o tempo de fermentação, menor o teor do contaminante no produto final [40].

## Produtos à base de café

Existem poucos trabalhos publicados sobre as estratégias de redução da acrilamida em café. Mas não é crível que as grandes empresas não estejam a desenvolver grandes esforços no sentido da redução da acrilamida [53].

A confeção do café pode ser realizada industrialmente ou pelo consumidor, existindo, contudo, poucas estratégias possíveis de se aplicar em ambos os casos. Alves *et al* constatou que a diluição do café diminui o teor de acrilamida [53,40].

Todavia, Banchemo *et al* [54] desenvolveu recentemente uma estratégia que consiste na remoção da acrilamida, através da extração supercrítica com CO<sub>2</sub> na fase do processamento do café, porém apenas pode ser aplicado a um nível industrial.

Como se verifica, existem diversas estratégias de redução, contudo também é possível a sua eliminação. A adição da enzima asparaginase permite a eliminação da asparagina, não ocorrendo a formação da acrilamida. A enzima pode ser empregue nos três grupos alimentícios, todavia é uma estratégia que acarreta muitos custos [40, 55–57].

## 2.1.6 Revisão dos métodos analíticos

Dado às propriedades físico-químicas da acrilamida, a sua deteção e quantificação em alimentos apresenta alguns problemas pelos quais os investigadores se debatem, tais como: o seu baixo peso molecular (71,08 Da) [1, 15, 43], baixa volatilidade [19], baixa retenção e elevada solubilidade em água (215,5g/100mL) [1, 15] em consequência da sua alta polaridade [59]. Por conseguinte, a análise da acrilamida em alimentos envolve um passo de extração, de purificação e pode ou não incluir derivatização [18, 45–47].

### Extração

Na etapa da extração, existem diversos solventes possíveis de aplicar. No entanto, é crucial ter em conta o composto em análise [18, 45, 47–49].

A água, à temperatura ambiente, é considerada um solvente apropriado para a extração da acrilamida, dado que, esta é hidrofílica e solúvel em água [18, 45, 47]. Porém, existem estudos que utilizam a água a uma temperatura entre 60 a 80°C [38]. Ainda que a água seja o solvente geralmente utilizado, para casos de alimentos com um elevado teor de gordura, o metanol é o mais apropriado [46, 47].

Vários autores sugerem ainda outros solventes, como por exemplo: etanol, isopropanol, acetonitrilo/água e metanol/água [18, 46, 48].

### Purificação

A presença de interferentes no extrato pode dificultar a separação cromatográfica e deteção do contaminante em análise, tornando-se essencial uma etapa de purificação [3, 19, 38, 62].

São várias as técnicas publicadas, sendo as mais recorrentes: a extração com solventes orgânicos que eliminam gorduras [63], a solução de Carrez [44–50], que permite a eliminação de proteínas e, por fim, a extração em fase sólida, a qual envolve a aplicação de diversos solventes [47, 48, 50, 51], de forma a assegurar a eliminação dos interferentes.

### Quantificação e determinação da acrilamida

A quantificação da acrilamida é geralmente realizada por cromatografia em fase gasosa ou fase líquida.

Normalmente, a cromatografia gasosa é precedida de derivatização através da bromação da acrilamida [18, 40, 44, 46, 52]. Este processo permite que se produza um composto mais volátil, aumentando a massa dos iões padrões no espectrofotómetro de massa (MS), melhorando a seletividade do método. Para este tipo de cromatografia é utilizado o espectrofotómetro de massa na deteção da acrilamida [61].

Na cromatografia líquida, devido à elevada polaridade do contaminante, é essencial escolher a fase móvel que permita obter um tempo de retenção viável. Existem métodos no qual se utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [40, 49, 53, 54] e mais recentemente a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) [44, 49, 54, 55]. Ambos os métodos podem ser acoplados a um detetor de Matriz de Fotodíodos (PDA) [60] ou espectrómetro de massa [18, 50, 52, 55–58].

## 2.2 Extração em fase sólida: SPE

A extração em fase sólida, Figura 2.5, tem por base o princípio da partição líquido-sólido, permitindo esta, a remoção de impurezas e o enriquecimento da amostra.

Para adquirir um extrato sem interferentes é crucial ter em consideração a polaridade e tamanho da molécula antes de se escolher o mecanismo, os solventes e a forma da SPE [60, 61].

A SPE está em constante progressão relativamente aos sorventes, solventes e formas utilizadas, bem como em relação ao procedimento de extração, que varia consoante o analito em causa. Este é composto por vários passos: o condicionamento, a equilibração, a carga, a lavagem e, por fim, a eluição [73].

Podem ser utilizados três tipos de mecanismos, partição de fase normal, de fase reversa e de troca iónica [73].

Na Tabela 2.3, é feita a distinção entre o mecanismo de partição de fase normal e fase reversa [73]. Quanto ao mecanismo de troca iónica, este funciona por meio de atrações electrostáticas, sendo que, caso o composto seja aniónico, são utilizados grupos de aminas alifáticas que se ligam à sílica. Por outro lado, no caso do composto catiónico são aplicados grupos alifáticos de ácido sulfónico [73].

**Tabela 2.3.** Caracterização dos mecanismos de partição [73]

Mecanismo	Matriz	Fase Estacionária	Analito
Partição de Fase Normal	Não Polar	Polar	Polar
Partição de Fase Reversa	Polar ou moderadamente polar	Não Polar	Não Polar

Os sorventes são materiais poliméricos tridimensionais, fabricados em determinadas condições, que proporcionam um material poroso com uma área superficial elevada. São fabricados três tipos de sorvente: o gel de sílica quimicamente modificado, os adsorventes poliméricos e o carvão grafitado ou poroso [73].

Na escolha da configuração do dispositivo é importante ter em consideração, não só o volume da amostra a ser utilizado, como também o volume desta depois da eluição. Os cartuchos nas formas de seringa e barril são os mais aplicados, existindo ainda em forma de discos [73].



Figura 2.5 Imagem ilustrativa do método SPE.

## 2.3 Métodos cromatográficos

A cromatografia é um método de separação que ao longo dos anos tem vindo a evoluir quanto à sua seletividade, especificidade e também rapidez. Esta técnica resume-se à separação de determinados componentes com base na interação entre a fase sólida e a fase estacionária [75].

Para a obtenção de uma separação satisfatória do composto ou compostos, é crucial selecionar uma fase móvel que apresente baixa viscosidade e uma boa solubilidade com o analito em estudo. A eluição pode ocorrer de forma isocrática, na qual a fase móvel é igual durante a corrida, ou por gradiente, ou seja, a concentração do solvente varia ao longo da corrida.

### 2.3.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência

O método UPLC rege-se pelos mesmos princípios fundamentais da cromatografia líquida de alta eficiência, distinguindo-se por um tamanho menor da partícula de enchimento da coluna, 2  $\mu\text{m}$  e no aumento da velocidade linear da fase móvel, comparativamente ao HPLC. Estas alterações possibilitam, desde logo, que a área de contacto aumente e que as pressões utilizadas aumentem, proporcionando um aumento de eficiência da coluna cromatográfica e uma melhoria na sua *performance*. Deste modo, a UPLC permite uma melhor resolução e sensibilidade do método [76, 77].

## 2.3.2 Colunas cromatográficas

A coluna cromatográfica é um dos elementos responsável pela separação dos componentes. Por conseguinte, é fundamental ter em conta as características químicas do analito em estudo na seleção da coluna [78].

A coluna escolhida para este trabalho foi a coluna ACQUITY UPLC BEH (ethylene bridge hybrid) C18 da Waters, uma vez que esta apresenta uma maior percentagem de carbono comparativamente às restantes colunas deste grupo, o que conduz a uma melhor resolução.

## 2.3.3 Detetores

O método cromatográfico utiliza detetores para a identificação dos componentes da mistura. Sendo crucial que a escolha deste tenha em atenção as propriedades dos compostos.

## Espectrofotómetro de massa

O espectrofotómetro de massa, Figura 2.6, baseia-se na proporção massa-carga ( $m/z$ ) para identificar os iões em estudo. O funcionamento deste é composto por várias etapas: formação de iões, seleção destes com base na  $m/z$  pelos quadrupolos, formação de transições e, por último, deteção de apenas uma transição com  $m/z$  específica.

No que respeita à fonte de iões, são diversas as técnicas de ionização à pressão atmosférica: ionização por electrospray (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a fotoionização à pressão atmosférica (APPI).

No caso em estudo, é utilizada como fonte de iões a ESI. Esta técnica tem como base a química para gerar iões dos compostos em solução [79]. Durante a ionização podem ser formados três tipos de iões, iões moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas e moléculas cati-onizadas ou anionizadas [80].

No caso específico da acrilamida, a amostra proveniente da coluna passa diretamente para a fonte de iões, no qual é sprayada para o cone. Neste apenas atravessam as moléculas com uma relação massa-carga específica.

Ao chegar à célula de colisão T-Wave, as moléculas são partidas através da injeção de gás de colisão, árgon. As várias transições passam, depois, por outro quadropolo, no qual apenas permite passar para o detetor, as moléculas de transição em estudo.

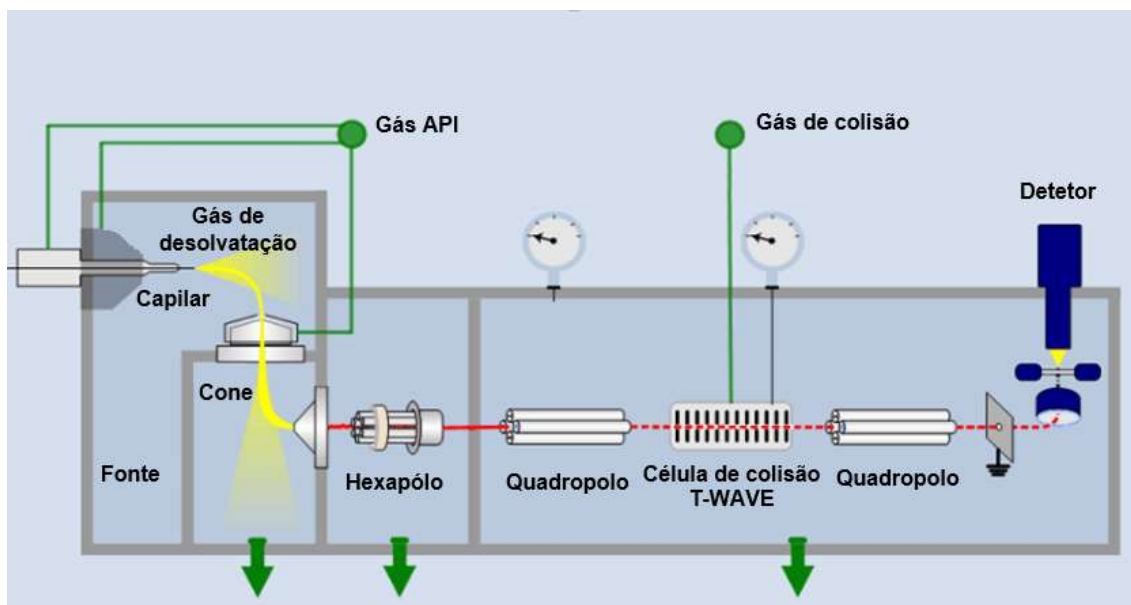


Figura 2.6 Representação esquemática do espectrofotômetro de massas do DAN-INSA.

## 2.4 Controlo da qualidade

O conceito de controlo da qualidade nos estudos de contaminantes na alimentação é essencial, uma vez que permite assegurar a veracidade dos resultados, testar o desempenho do laboratório e também validar os procedimentos realizados pelo laboratório. Para tal, são utilizados materiais de referência e testes de desempenho inter-laboratoriais, indexados na base de dados, como o Code d'Indexation des Matériaux de Référence (COMAR), European Proficiency Testing Information System (EPTIS) e Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) respetivamente.

Estão disponíveis materiais de referência certificados contendo acrilamida em tostas e em pão torrado, com valores certificados para  $0.98 \pm 0.09$  mg/Kg (ERM<sup>®</sup>-BD272) e  $425 \pm 7$  ng/g (ERM<sup>®</sup>-BD273), respetivamente [27].

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1 Amostras**

As amostras utilizadas para a identificação e quantificação de acrilamida foram obtidas aleatoriamente em pastelarias. Foram fornecidas amostras de queques, pastéis de nata, pastéis de bolota, pastéis de chicharo, bolachas, tortas, folhados, bolos e 13 variedades de pão.

As amostras de pães, para o estudo da redução da acrilamida, foram confeccionadas no DAN-INSA com o âmbito de ter um maior controlo das condições de preparação. Encontra-se em anexo, Anexo A – Identificação das amostras de ocorrência, a tabela com a identificação das amostras.

As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um moinho de laboratório, fechadas a vácuo e armazenadas no congelador a -20°C, até posterior análise.

#### **3.2 Reagentes e Padrões**

Para o presente estudo foram utilizados os seguintes reagentes: Acetonitrilo (Merck, gradient grade for liquid chromatography), Ácido fórmico (Group Carlo Erba Reagents, 99% for analysis), Metanol (Merck, hypergrade for LC-MS) e água ultrapura tipo 1, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q.

O padrão que foi utilizado para a identificação da acrilamida foi o padrão de acrilamida (99,0% Dr. Ehrenstorfer GmbH).

#### **3.3 Instrumentação**

Para a homogeneização das amostras foi utilizado um moinho de facas, Knife Mill Grindomix GM 200. Na extração do composto a analisar neste estudo, utilizou-se uma centrífuga Eppendorf centrifuge 5804 R, um agitador tipo shaker vortex, um agitador Kline e as colunas de SPE (BondElut plexa (6 mL, 200 mg)). Na identificação e quantificação da acrilamida utilizou-se o cromatógrafo líquido de ultra eficiência sistema ACQUITY UPLC acoplado a um espectrómetro de massa ACQUITY UPLC e uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm, todos da marca Waters.

### **3.4 Análise da acrilamida**

Na sequência dos objetivos propostos para este trabalho, com o intuito de se identificar e quantificar a acrilamida nas amostras, houve a necessidade de se recorrer inicialmente a uma extração e purificação das mesmas.

#### **3.4.1 Extração e purificação**

Procedeu-se à extração da acrilamida das amostras recorrendo a uma mistura de dois solventes água acidificada (0,1% ácido fórmico). Os extratos foram preparados de acordo com o procedimento escrito por Zhang et al. [81], com algumas modificações.

Preparou-se, previamente, uma solução de água/ácido fórmico (0,1%).

Pesou-se, aproximadamente, 2 g de amostra no tubo de centrifuga e acrescentou-se de seguida 20 mL água/ácido fórmico. Os tubos foram agitados num agitador vortex durante 2 minutos e colocados num agitador oscilante durante 30 minutos a 70 oscilações por minuto.

Após o tempo de extração, a mistura foi colocada na centrífuga a 10000 rpm durante 15 minutos, à temperatura ambiente.

Para a purificação das amostras recorreu-se à extração em fase sólida.

Condicionou-se a coluna com 3,5 mL de metanol, de seguida equilibrou-se com 3,5 mL de água/ácido fórmico. Adicionou-se, posteriormente 1,5 mL de amostra e eluiu-se com 3 mL de água/ácido fórmico.

O conteúdo referente às duas últimas etapas foi recolhido para um balão de 10 mL, completando-o com água/ácido fórmico.

Todas as soluções de extrato foram armazenadas em câmara refrigerada a 4°C, até posterior análise.

### **3.5 Identificação e caracterização da acrilamida por UPLC-MS**

Foi desenvolvido o método para a identificação e quantificação da acrilamida por UPLC-MS.

As condições operacionais para a identificação da acrilamida por UPLC-MS estão referidas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Parâmetros instrumentais e condições operacionais do sistema UPLC-MS

<b>Temperatura da coluna (°C)</b>	25
<b>Temperatura da amostra (°C)</b>	4
<b>Fluxo (mL/min)</b>	0,2
<b>Volume de injeção (µL)</b>	10
<b>Solvente A</b>	Água/ácido fórmico (0,1%)
<b>Solvente B</b>	Acetonitrilo/ácido fórmico (0,1%)
<b>Gradiente</b>	Solvente A: 90% Solvente B: 10%
<b>Tempo de corrida (minutos)</b>	3

As condições da fonte de eletrospray foram: tensão capilar, 3 kV; tensão do cone, 29 V; a temperatura da fonte, 120°C; a temperatura do gás de dessolvatação, 350°C; fluxo do gás de dessolvatação, 5 L/h; Fluxo do gás no cone, 30 L/h e, por fim, a pressão do gás de colisão argon,  $3 \times 10^{-3}$  mbar.

O padrão de acrilamida foi dissolvido em água/ácido fórmico (0,1%) com uma concentração de 90000 µg/µL. Foram realizadas diluições, obtendo-se seis concentrações diferentes 0, 1, 10, 50, 150 e 250 µg/µL.

A identificação da acrilamida foi feita por comparação dos tempos de retenção das amostras com o tempo de retenção do padrão externo de acrilamida.

### 3.6 Controlo da qualidade

Foi utilizado um material de referência certificado, BCR com a amostra de pão, de forma a assegurar que a determinação do contaminante em estudo é precisa. Participou-se num estudo interlaboratorial, FAPAS, analisando uma amostra de bolacha.

### 3.7 Análise Estatística

A análise estatística foi elaborada utilizando a análise de variância com um fator a vários níveis (One-way ANOVA) para averiguar se existiam diferenças entre as amostras, e o teste da menor diferença significativa (LSD) para um nível de significância de 5%. Foram ainda realizados estudos de correlação, utilizando o coeficiente de correlação linear de Spearman ( $\rho$ ), em alguns grupos de amostras.

Toda a análise estatística foi executada utilizando o programa Statsoft STATISTICA 13.0.



## 4. Apresentação e Discussão de Resultados

### 4.1 Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas

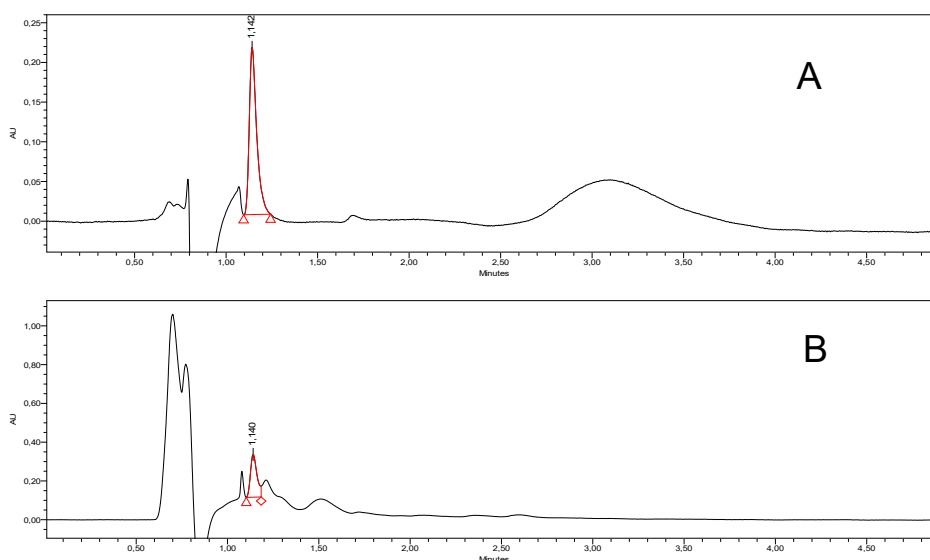
A determinação da acrilamida, como foi mencionado em capítulos anteriores, tem grandes limitações devido à variedade de alimentos no qual se forma.

A identificação e quantificação deste contaminante foi inicialmente realizada através da UPLC acoplada a um detetor PDA, a 205 nm. Este método foi desenvolvido como descrito em Zhang et al. [81] com algumas modificações. Na Tabela 4.1, encontram-se representadas as condições de UPLC-PDA utilizadas.

**Tabela 4.1** Parâmetros instrumentais e condições operacionais do sistema UPLC-PDA

<b>Temperatura da coluna (°C)</b>	25
<b>Temperatura da amostra (°C)</b>	4
<b>Fluxo (mL/min)</b>	0,2
<b>Volume de injeção (µL)</b>	10
<b>Solvente</b>	Água/ácido fórmico (0,1%)
<b>Gradiente</b>	Isocrático: Solvente A: 100%

Utilizando as condições e o gradiente acima descritos, Tabela 4.1, obteve-se o cromatograma que se encontra representado na Figura 4.1 com um tempo de corrida de 5 minutos.



**Figura 4.1** Cromatograma de acrilamida. (A) Padrão de acrilamida; (B) Amostra de pão de especiarias.

Pode constatar-se, pela análise dos cromatogramas demonstrados na Figura 4.1, que existem interferências de compostos hidrossolúveis, provenientes das amostras em análise, e que estas exibem o mesmo tempo de retenção da acrilamida, o que dificulta a detecção e quantificação desta.

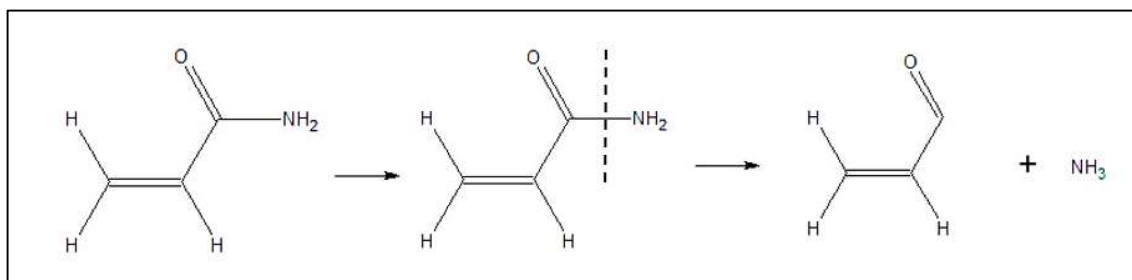
Foi então desenvolvido um novo método, testando-se outro detetor, o espectrômetro de massa, tendo sido necessário a otimização dos parâmetros deste.

Para a identificação da acrilamida e otimização dos parâmetros do detetor, foi realizada uma injeção direta de acrilamida e de padrão interno, D<sub>3</sub>-acrilamida. Na Tabela 4.2 encontram-se os parâmetros otimizados do espectrofotômetro de massa.

**Tabela 4.2** Parâmetros otimizados do MS

<b>Tensão Capilar (kV)</b>	2,50
<b>Tensão do cone (V)</b>	29
<b>Temperatura do cone (°C)</b>	120
<b>Temperatura de desolvatação (°C)</b>	350
<b>Fluxo de gás de desolvatação (L/h)</b>	800
<b>Fluxo de gás no cone (L/h)</b>	30

A detecção da acrilamida foi efetuada através da transição que obteve maior intensidade de pico, 72>55 m/z, Figura 4.2, com uma energia de colisão de 20 V.



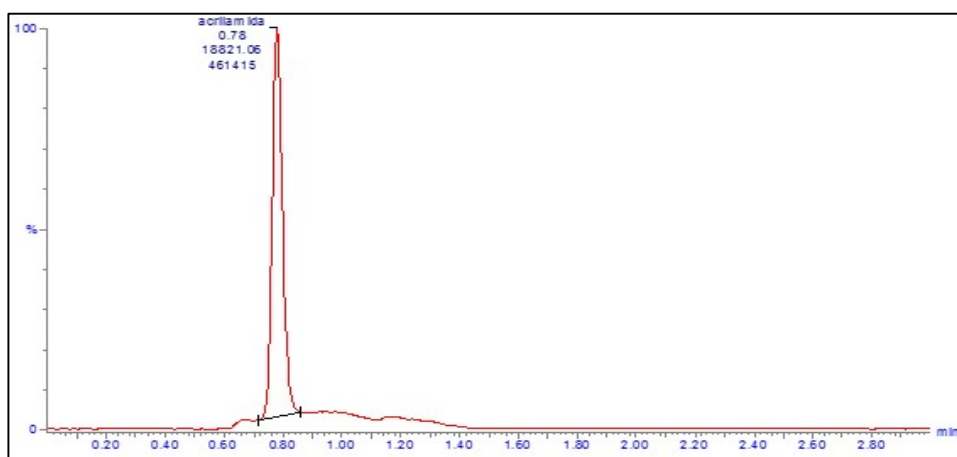
**Figura 4.2** Transição 72>55 m/z.

Seguidamente foram testadas as condições cromatográficas representadas na Tabela 4.3, conseguindo diminuir-se o tempo de retenção de 5 para 3 minutos.

**Tabela 4.3** Parâmetros instrumentais e condições operacionais do sistema UPLC-MS

<b>Temperatura da coluna (°C)</b>	25
<b>Temperatura da amostra (°C)</b>	4
<b>Fluxo (mL/min)</b>	0,2
<b>Volume de injeção (µL)</b>	10
<b>Solvente A</b>	Água/ácido fórmico (0,1%)
<b>Solvente B</b>	Acetonitrilo
<b>Gradiente</b>	Isocrático: Solvente A: 90% Solvente B: 10%

O cromatograma resultante das alterações de PDA para MS encontra-se representado na figura seguinte, Figura 4.3.



**Figura 4.3** Cromatograma da acrilamida.

Com o novo método, visualiza-se que não existe interferências de matriz no cromatograma, concluindo-se que este é adequado à análise de acrilamida. Foi então realizada a análise às amostras com o método UPCL-MS, nas condições acima referidas, Tabela 4.2 e Tabela 4.3.

Na Tabela 4.4, apresentam-se as figuras de mérito do método analítico utilizado para a determinação da acrilamida.

**Tabela 4.4** Características analíticas para a determinação da acrilamida

<b>Padrão</b>	<b>Tempo de retenção <sup>a</sup></b>	<b>Gama de trabalho <sup>b</sup></b>	<b>Equação Linear</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Acrilamida	3	1-250	$y = 75,057x - 41,087$	0,9999

R<sup>2</sup>- Coeficiente de Correlação; <sup>a</sup>minutos; <sup>b</sup>µg/L

A quantificação da acrilamida nos extratos foi realizada usando a curva de calibração na gama de 1 a 250 µg/L, Figura 4.4. Tendo esta sido linear na faixa representada e ter apresentado coeficientes de correlação superiores a 0,9999.

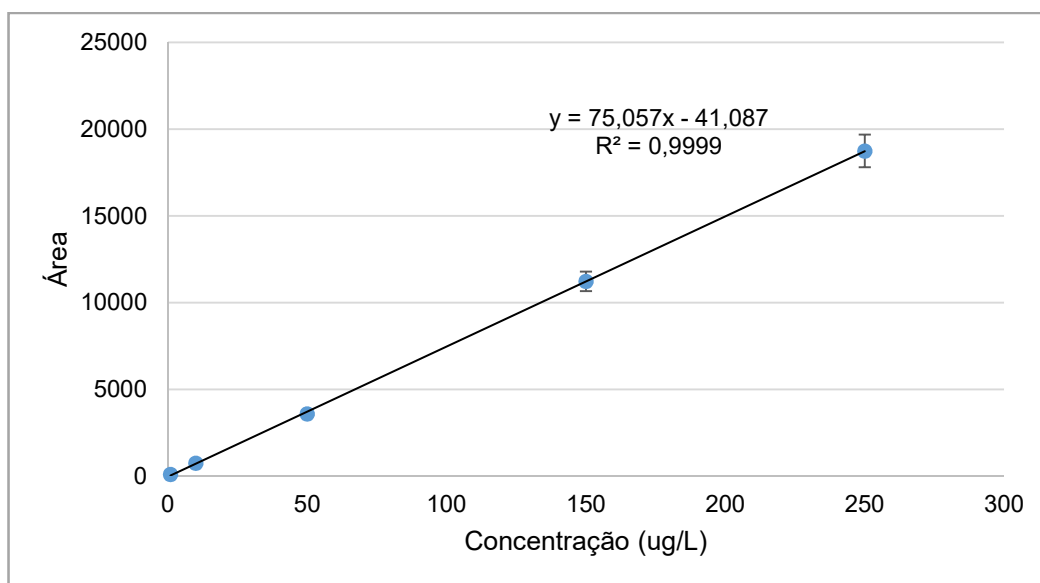


Figura 4.4 Curva de calibração de acrilamida.

Para garantir a exatidão do teor de acrilamida nas amostras, foi utilizado o material de referência, FAPAS de bolacha, obtendo-se um resultado aceitável, com um z-score de -0,6.

## 4.2 Ocorrência de acrilamida em produtos de pastelaria e panificação

O consumo de alimentos processados à base de cereais é um grupo com elevado consumo em Portugal, Figura 2.4. Neste estão incluídos os produtos de pastelaria e panificação entre outros. Assim, estudou-se o teor de acrilamida nos respetivos produtos.

Os ensaios foram realizados em duplicado nos produtos de pastelaria e em triplicado nos de panificação. Os resultados foram expressos em µg de acrilamida por kg de alimento, e encontram-se representados nas Tabela 4.5 à Tabela 4.9.

Com o objetivo de se identificar as diferenças significativas existentes, recorreu-se à análise de variância com um fator e vários níveis (One-Way ANOVA) e ao teste de menor diferença significativa (LSD). De forma a validar os resultados obtidos, procedeu-se à validação dos pressupostos subjacentes à ANOVA, a partir da análise de resíduos e respetivas representações gráficas: verificação da normalidade, verificação da independência e verificação da homogeneidade da variância. Estas análises encontram-se em anexo, Anexo B – Análise de variância do estudo de ocorrência.

Dado que apenas se realizaram duas a três réplicas nas amostras, a dimensão desta é muito reduzida, podendo pôr em causa as interpretações gráficas da análise de resíduos, dificultando a validação dos pressupostos subjacentes à ANOVA. Esta limitação pode levar a resultados pouco fiáveis, pondo em causa as conclusões obtidas da análise de variância.

## 4.2.1 Produtos de Pastelaria

Os produtos de pastelaria foram divididos em quatro grupos distintos: queques, bolachas, pastéis e outros. Na categoria outros foram alocados todos os produtos que não se inseriam nas restantes categorias.

### Queques

Neste grupo foram estudadas diversas variedades de queques: queque de chocolate, de amêndoa, aveia e simples. Na Tabela 4.5, apresentam-se os resultados obtidos relativos ao teor de acrilamida presente nas respetivas amostras.

**Tabela 4.5** Resultado do teor de acrilamida nas amostras de queque

Amostra		Acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Queques	Chocolate	1057,7 <sup>a</sup> $\pm$ 6,9
	Amêndoa	922,7 <sup>b</sup> $\pm$ 20,4
	Aveia	677,0 <sup>c</sup> $\pm$ 11,4
	Simple	676,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,3

<sup>a, b, c</sup> Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão expressos em Médias  $\pm$  Desvio padrão,  $n=2$ .

Pela análise da Tabela 4.5, pode constatar-se que as amostras de queque de aveia e simples são significativamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ). Este resultado pode ser justificado pela semelhança da quantidade de açúcares e proteína entre os queques de aveia e simples. As restantes amostras são significativamente diferentes entre si. Verifica-se ainda que, os teores de acrilamida variam entre 676 a 1057,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sendo que o valor mais elevado corresponde ao queque de chocolate.

Os teores adquiridos nas variedades de queques são mais elevados do que os citados por Svensson *et al.*, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para muffins [82]. O mesmo se constata em relação ao resultado do estudo de Dybing *et al.*, 20,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [28]. Verifica-se ainda que, todas as amostras encontram-se acima da gama de valores reportados pela EFSA em 2015, 61 a 71  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para pastelaria e bolos [27].

## Bolachas

Foi estudado o teor de acrilamida em cinco tipos de bolachas, chocolate, cacau, manteiga e caramelo. Os resultados encontram-se representados na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6** Resultado do teor de acrilamida nas amostras de bolachas

Amostra		Acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Bolachas	Húngaros	948,2 <sup>a</sup> $\pm$ 60,6
	Crocantes de Cacau	222,4 <sup>b</sup> $\pm$ 10,9
	Apertados	218,8 <sup>b</sup> $\pm$ 10,5
	Caramelo	110,0 <sup>c</sup> $\pm$ 2,3
	Gregos	354,9 <sup>d</sup> $\pm$ 11,1

a, b,c,d Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão expressos em Médias  $\pm$  Desvio padrão,  $n=2$ .

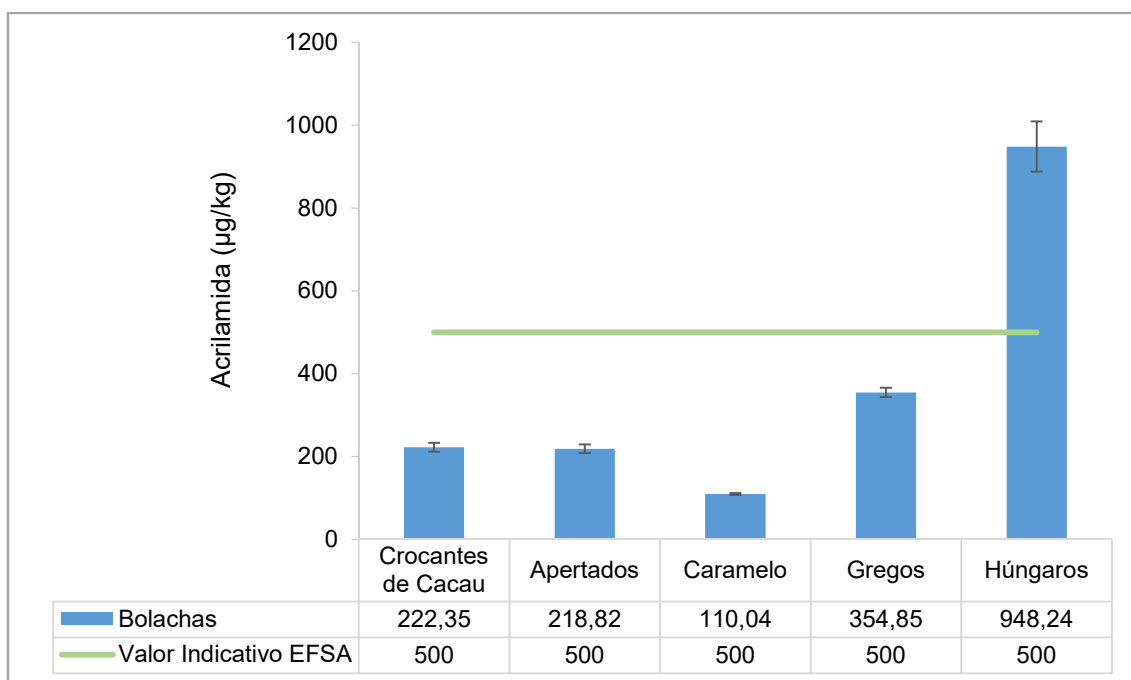
No grupo das bolachas, observa-se que as amostras de crocantes de cacau e apertados são semelhantes entre si e as restantes amostras são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de LSD ( $p < 0,05$ ).

As bolachas de caramelo apresentam a quantidade de acrilamida mais baixa relativamente às restantes. Este comportamento poderá estar relacionado com o facto de o caramelo resultar da decomposição da frutose e glucose, existindo por isso uma menor quantidade de açúcares durante o processamento do produto.

As amostras à base de manteiga, designadas por apertados e gregos, encontram-se abaixo do valor descrito por Hoenicke *et al.*, 546  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [83].

Os resultados reportados por Pedreschi *et al*, 289  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para bolachas [84], são inferiores às amostras de húngaros e gregos. Além disso, verificou-se que apenas as bolachas de caramelo se encontram abaixo do valor obtido no estudo de ocorrência da EFSA, 206  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [27].

Como referido no capítulo 2.1.4 – Dados de ocorrência da acrilamida em alimentos processados, a EFSA definiu valores indicativos para alguns géneros alimentícios, sendo as bolachas um dos grupos incluídos. Na Figura 4.5, comparou-se os valores obtidos neste grupo de amostras e o valor indicativo da EFSA, 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Tabela 2.2 [27].



**Figura 4.5** Comparação do teor de acrilamida nas bolachas e valores indicativos da EFSA

Com base na Figura 4.5, constatou-se que os dados descritos neste estudo encontram-se abaixo do valor indicativo da EFSA, com exceção das amostras de bolachas húngaras, que estão 52% acima do valor referido pela EFSA.

## Pastéis

Na Tabela 4.7, apresentam-se os resultados referentes ao grupo de pasteis, o qual engloba produtos tradicionais de Portugal, como o pastel de nata, pastel de bolota e o pastel de chicharo.

**Tabela 4.7** Resultado do teor de acrilamida nas amostras de Pastéis

Amostra		Acrilamida (µg/kg)	
Pastéis	Pastel de nata	Inteiro	575,9 <sup>a</sup> ±9,9
		Creme	771,7 <sup>b</sup> ±14,9
		Massa	278,1 <sup>c</sup> ±0,4
	Pastel de bolota	Inteiro	768,4 <sup>b</sup> ±9,4
		Creme	912,2 <sup>d</sup> ±6,4
		Massa	660,8 <sup>e</sup> ±33,6
	Pastel de Chicharo		808,9 <sup>f</sup> ±8,6

<sup>a, b, c, d, e, f</sup> Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão,  $n=2$ .

Analisando a Tabela 4.7, verifica-se que os teores de acrilamida variam entre 278 e 912 µg/kg, sendo que a amostra que apresenta maior teor de contaminante é o creme de pastel de bolota. Pode observar-se ainda que apenas o creme de pastel de nata e o pastel de bolota não são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$  pelo teste LSD).

Comparando os valores adquiridos neste estudo com os da EFSA, Tabela 2.1, constata-se que as amostras de pastéis se encontram acima do valor referido pela EFSA [27].

Considerando apenas os pastéis, o pastel de chicharro tem o maior teor de acrilamida. Porém, este resultado não está de acordo com os valores nutricionais dos alimentos, uma vez que a bolota contém uma quantidade superior de hidratos de carbono em relação aos restantes, tornando-se, por isso, necessário um estudo mais aprofundado para perceber se existe algum composto no pastel de bolota que possibilita a redução dos hidratos de carbono e, consequentemente, a da acrilamida.

É ainda possível visualizar que, o creme e massa dos pastéis de nata e bolota têm o mesmo comportamento, ou seja, o creme possui um valor mais elevado que a massa e o pastel inteiro. Este resultado sugere que durante o processamento de ambos os pastéis ocorre uma reação de mitigação da acrilamida, contudo é essencial a realização de mais testes.

## Outras amostras

Como referido anteriormente, este grupo envolve amostras de pastelaria que não se inserem nos restantes grupos. Na Tabela 4.8, apresentam-se os resultados das amostras de tortas, folhado misto, trouxa filo, e pão de deus.

**Tabela 4.8** Resultado do teor de acrilamida nas Outras amostras

Amostra		Acrilamida (µg/kg)
Outras	Torta de Coco	3429,8 <sup>a</sup> ± 28,2
	Torta de Laranja	1084,0 <sup>b</sup> ± 18,7
	Folhado Misto	3742,8 <sup>c</sup> ± 57,0
	Bolo de Coco	605,4 <sup>d</sup> ± 14,4
	Trouxa Filo	3862,1 <sup>c</sup> ± 214,2
	Pão de Deus	994,5 <sup>b</sup> ± 48,9

<sup>a, b, c, d</sup> Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão,  $n=2$ .

No que respeita aos teores de acrilamida reportados na Tabela 4.8, verifica-se que o folhado misto e a trouxa filo são significativamente semelhantes entre si. O mesmo se pode afirmar quanto às amostras torta de laranja e pão de deus ( $p > 0,05$ , pelo teste LSD).

Os valores adquiridos nesta análise variam entre 605 e 3862 µg/kg, sendo que as amostras com maiores teores de acrilamida são referentes à trouxa filo, folhado misto e torta de coco. A elevada quantidade de contaminante nas amostras referidas poderá estar relacionada com o teor de asparagina e açúcares redutores presente nas massas utilizadas na confeção.

Dybing *et al.* reportou dados de ocorrência de produtos de pastelaria inferiores aos descritos na Tabela 4.8, 34 µg/Kg [28]. O mesmo se verificou em relação aos estudo realizado pela EFSA, Tabela 2.1, o qual obteve uma gama entre 61 e 71 µg/Kg em produtos de pastelaria [27]. Esta diversidade de resultados poderá estar relacionada com os ingredientes usados na confeção (composição nutricional) e também com as condições de processamento aplicadas, como por exemplo, a temperatura.

## 4.2.2 Produtos de panificação

Na Tabela 4.9, encontram-se os dados de ocorrência relativos aos produtos de panificação, nos quais estão inseridos algumas das variedades de pão que são consumidos pela população portuguesa.

**Tabela 4.9** Resultados do teor de acrilamida nas amostras de panificação

Amostra		Acrilamida (µg/kg)
Pão	Broa	328,8 <sup>a</sup> ± 4,5
	Baguete	137,9 <sup>b</sup> ± 9
	Baguete Integral	312,7 <sup>a</sup> ±16,7
	Pão Cereais	298,9 <sup>a</sup> ±3,7
	Pão	542,0 <sup>c</sup> ± 33,8
	Pão Centeio	625,8 <sup>d</sup> ± 26,1
	Bola	310,3 <sup>a</sup> ±11,5
	Pão tremçoço	786,9 <sup>e</sup> ± 3,2
	Pão Azeitonas e Nozes	247,5 <sup>f</sup> ± 3,6
	Pão Canela	1159,7 <sup>g</sup> ± 5,4
	Pão Azeitonas	1235,8 <sup>h</sup> ± 52,3
	Pão Coco	741,2 <sup>i</sup> ± 35,3
	Pão Beterraba	1149,8 <sup>g</sup> ± 3,3

<sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup> Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD (p<0.05). Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio Padrão, n=3.

Pela Tabela 4.9, observa-se que os teores do contaminante em estudo variam entre 138 e 1236  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sendo que a variedade de pão que apresenta maior teor de acrilamida é o pão de azeitonas, seguido do pão de canela e do pão de beterraba.

O teor elevado de acrilamida no pão de canela pode ser explicado com a quantidade de canela adicionada, uma vez que esta especiaria aumenta o teor de acrilamida em alimentos [85]. Relativamente aos pães de azeitonas e de beterraba, aferiu-se que estes alimentos contêm valores não muito elevados de açúcares e proteínas, concluindo-se que os valores elevados poderão estar relacionados com a farinha e o método de processamento.

Pelo teste LSD ( $p>0,05$ ) constata-se que as amostras de broa, baguete integral, pão de cereais e bola são semelhantes entre si. Verificando o mesmo para o pão de canela e pão de beterraba.

Verifica-se pela Tabela 4.9, que os pães de trigo possuem valores inferiores ao de centeio. Este resultado está de acordo com os valores nutricionais das duas farinhas, dado que a farinha de centeio contém maior quantidade de açúcares do que a de trigo.

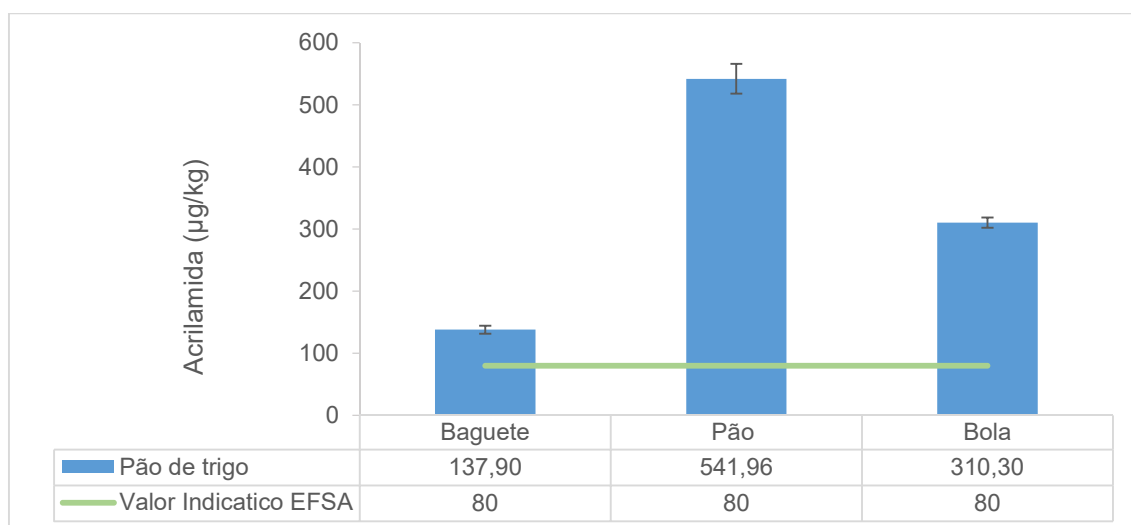
Konings *et al.* [86] fizeram a determinação de acrilamida em pão de centeio, tendo obtido um valor inferior, 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ao adquirido neste estudo.

Quanto aos pães de trigo, observa-se que os teores obtidos são inferiores ao reportado por Wenzl *et al.* 1987  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [87]. Por outro lado, são superiores aos resultados divulgados por Konings *et al.* [86], 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Svensson *et al.* adquiriu valores na gama de 30 a 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [82], para pães de farinha de trigo, sendo estes superiores à amostra de baguete.

Comparando os resultados adquiridos com os resultados da EFSA, em 2015, averigua-se que todas as amostras se encontram acima do valor encontrado, 49  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  [27]. O mesmo se verifica no estudo da EFSA em 2010, o qual obteve o teor de 30  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  [84].

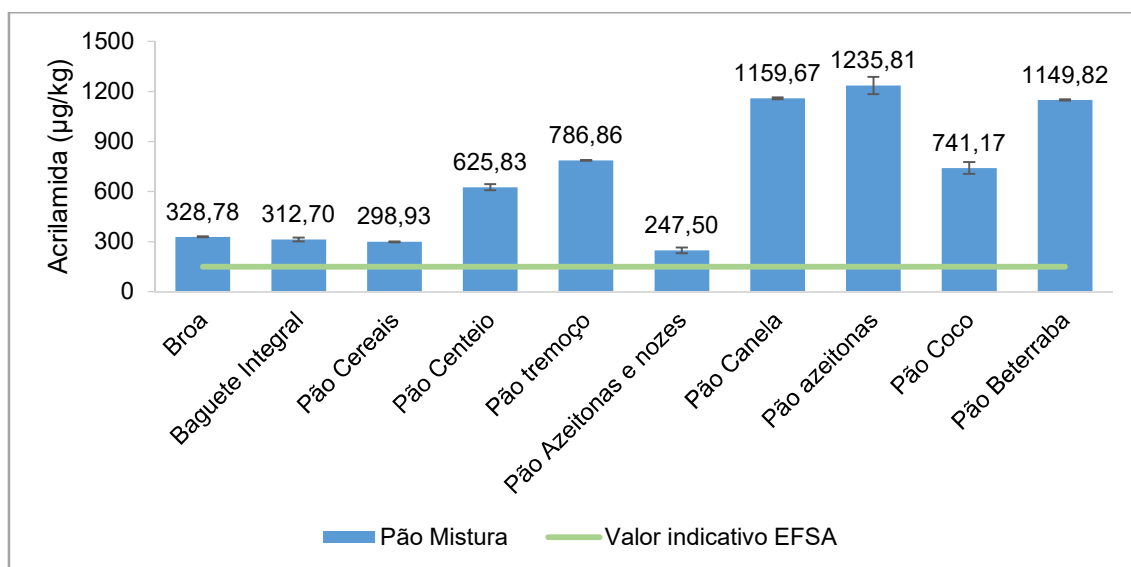
Na Figura 4.6, observa-se a comparação dos dados de ocorrência de panificação à base trigo com os valores indicativos referidos pela EFSA em 2015.



**Figura 4.6** Comparação dos dados obtidos das amostras de panificação e os valores indicativos para pão de trigo da EFSA [27].

Analisando a Figura 4.6, verifica-se que as três amostras ultrapassam o valor indicativo da EFSA, referente a pão de trigo, Tabela 2.2 [27], sendo que, o pão ultrapassa 6,78 vezes o valor indicativo, seguido da bola (3,88 vezes) e, por fim, a baguete que está 1,72 vezes acima do valor referido. Estes resultados são preocupantes, sendo necessário mais estudos para apurar a razão para estes pães de trigo conterem teores de acrilamida superiores aos indicados pela EFSA [27], havendo necessidade de se encontrar soluções para a sua diminuição.

Para as amostras de pão com base em misturas de farinhas foi também realizado um estudo de comparação, Figura 4.7, entre os resultados obtidos e os valores indicativos da EFSA, Tabela 2.2 [27].



**Figura 4.7** Comparação dos dados obtidos das amostras de panificação e os valores indicativos para pão da EFSA [27].

Pela Figura 4.7, constata-se que as amostras de pão de azeitonas, pão de canela e pão de beterraba encontram-se acima do valor indicativo, 150 µg/kg. O pão de azeitonas e nozes é o que se encontra mais perto do valor referido pela EFSA, 1,65 vezes mais do que o referido valor.

Pode observar-se também que o pão de centeio é dos pães sem aditivos que ultrapassa o valor indicativo, cerca de 4,17 vezes acima deste.

Perante os resultados observados neste estudo de ocorrência, surgiu a necessidade de se realizar testes de forma a se tentar diminuir a concentração de acrilamida, tendo sido realizado um produto de pastelaria para esse fim.

Com fundamento em alguns estudos já realizados, foram adicionados alguns aditivos ao produto, com o intuito de se verificar se ocorria ou não uma redução de acrilamida. Foram então selecionadas 4 misturas. Os resultados obtidos estão referidos na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10** Resultados do teor de AA nas amostras do produto de pastelaria

Amostra	Acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Controlo	536,1 <sup>a</sup> $\pm$ 44,5
Mistura A	638,3 <sup>b</sup> $\pm$ 23,5
Mistura B	506,0 <sup>a</sup> $\pm$ 2,3
Mistura C	713,0 <sup>b</sup> $\pm$ 65,9
Mistura D	645,9 <sup>b</sup> $\pm$ 25,7

<sup>a,b</sup> Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão expressos em Médias  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=3$ .

Através da análise da Tabela 4.10, verifica-se que as amostras de produto controlo e B são semelhantes entre si, com  $p > 0,05$ . O mesmo se observa para as restantes amostras.

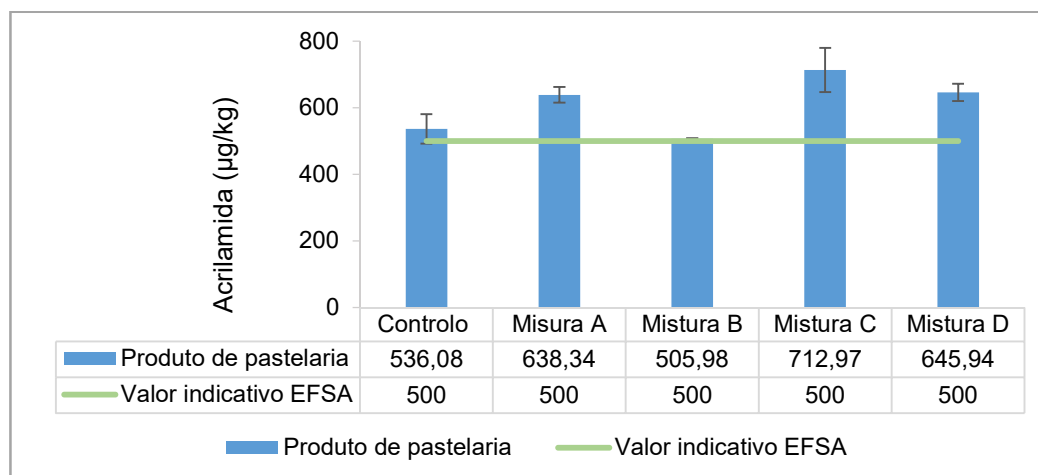
A adição da mistura B permitiu cerca de 5,6% de redução de acrilamida, no produto final. Já os restantes aditivos provocaram uma maior quantidade deste contaminante. É importante mencionar que todas as amostras deste produto foram confeccionadas nas mesmas condições e com os mesmos ingredientes, pelo mesmo *chef*.

Quando comparados os teores obtidos com os resultados reportados pela EFSA 101  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Tabela 2.1, observa-se que estes se encontram muito acima [27].

Os resultados adquiridos podem estar relacionados com o elevado teor de proteína e açúcares que constituem as misturas.

No entanto, é fundamental realizar mais estudos, uma vez que, a quantidade de misturas A, C e D adicionadas não foram suficientes para que ocorresse redução do teor de contaminante no produto final.

Identicamente aos produtos de pastelaria, foi realizada uma comparação, Figura 4.8, entre os resultados obtidos neste estudo com os valores indicativos da EFSA (Tabela 2.2) [27].



**Figura 4.8** Comparação dos dados obtidos das amostras do produto de pastelaria e os valores indicativos da EFSA [27].

Na Figura 4.8, constatou-se que, apesar de no produto de pastelaria B ocorrer uma diminuição de acrilamida, esta ainda não é suficiente, uma vez que continua a estar acima do valor indicativo dado pela EFSA [27], tornando-se, por isso, necessário, a realização de mais estudos de modo a que se consiga uma percentagem de redução mais elevada.

## Análise global do estudo de ocorrência

Com a finalidade de se fazer uma análise global entre os diferentes grupos de amostras, procedeu-se ao cálculo das médias de cada grupo de amostras. Na tabela 4.11, apresentam-se também os valores mínimos e máximos de cada grupo.

**Tabela 4.11** Resultado geral de ocorrência de acrilamida

Amostra	Mínimo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Máximo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Queques	676,0 $\pm$ 0,3	833,4 $\pm$ 9,8	1057,7 $\pm$ 6,9
Bolachas	110,0 $\pm$ 2,3	370,9 $\pm$ 19,1	948,2 $\pm$ 60,6
Pastéis	278,1 $\pm$ 0,4	192,0 $\pm$ 9,3	912,2 $\pm$ 6,4
Pão de trigo	137,9 $\pm$ 9	330,1 $\pm$ 15,4	542,0 $\pm$ 33,8
Pão (exceto de trigo)	1235,8 $\pm$ 52,3	688,7 $\pm$ 18,1	247,5 $\pm$ 3,6
Outras	605,4 $\pm$ 14,4	2286,0 $\pm$ 63,6	3862,1 $\pm$ 214,2

Pode concluir-se, pela Tabela 4.11, que o grupo com maior média de teor de acrilamida é o grupo referente a Outras amostras, com um valor de 2286,43  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sendo seguido pelos Queques (833,35  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e pão com mistura de farinhas, 688,71  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Contrariamente, os pastéis correspondem à média mais baixa deste estudo de ocorrência, 192  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Observa-se que as bolachas apresentam o valor mais baixo do mínimo detetado nas amostras, 110,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

As amostras Outras, além de ter a média mais elevada, possui o valor máximo mais alto, 3862,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Estes resultados podem ser justificados pelo elevado teor de hidratos de carbono que as amostras contêm.

Verifica-se ainda que existe uma diferença de cerca de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  entre o pão de trigo e o pão com misturas de farinhas, o que permite afirmar que é fundamental ter em consideração o valor nutricional da farinha, uma vez que esta contém os precursores da formação da acrilamida.

## 4.3 Estratégias de redução

Com base nos resultados de ocorrência de acrilamida em produtos de panificação, resolveu-se continuar o estudo de adição de vários aditivos, com o intuito de reduzir este contaminante, de acordo com a bibliografia encontrada [20, 21, 24, 44, 58, 90–92].

Nos testes foram utilizadas duas bases, A e B, na confeção dos produtos.

Foi ainda realizado um estudo de correlação entre o tempo de fermentação do produto com base A e o teor de acrilamida no final da confeção deste.

### 4.3.1 Adição de ingredientes e aditivos

Tal como anteriormente em 4.2 – Ocorrência de acrilamida em produtos de pastelaria e panificação, recorreu-se à one-way ANOVA e ao teste LSD, para se verificar se existiam, ou não, diferenças significativas entre as diferentes amostras.

As análises de variância e as respetivas verificações dos pressupostos e conclusões, assim como os testes LSD, encontram-se em anexo, Anexo C – Análise de variância das estratégias de redução. Neste caso, a dimensão da amostra ( $n=3$ ) continua a ser muito pequena, podendo a validação dos pressupostos subjacentes à ANOVA ser igualmente dificultada. Esta limitação pode conduzir a resultados pouco fiáveis, pondo em causa as conclusões obtidas da análise de variância.

#### Produto com base A

Na Tabela 4.12 apresentam-se os resultados obtidos relativos aos produtos confeccionados com base A. Todos os produtos foram confeccionados nas mesmas condições no DAN-INSA.

Foi confeccionado um produto controlo, ou seja, sem a adição de nenhum ingrediente ou aditivo, de modo a se conseguir identificar se existe redução ou aumento de AA.

**Tabela 4.12** Resultados do teor de acrilamida em produtos com base A

<b>Amostras</b>	<b>Acrilamida (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
Produto controlo	269,4 <sup>a</sup> $\pm$ 5,2
Mistura 1	1182,4 <sup>b</sup> $\pm$ 14,1
Mistura 2*	834,5 <sup>c</sup> $\pm$ 18,5
Mistura 3*	59,9 <sup>d</sup> $\pm$ 4,0
Mistura 4*	807,9 <sup>c</sup> $\pm$ 2,1
Mistura 5*	715,7 <sup>e</sup> $\pm$ 2,3
Mistura 6	344,6 <sup>f</sup> $\pm$ 2,5
Mistura 7	937,3 <sup>g</sup> $\pm$ 15,1
Mistura 8	1105,4 <sup>h</sup> $\pm$ 23,6
Mistura 9	546,2 <sup>i</sup> $\pm$ 3,0
Mistura 10	575,9 <sup>i</sup> $\pm$ 7,6
Mistura 11	1273,1 <sup>j</sup> $\pm$ 29,0
Mistura 12	783,4 <sup>c</sup> $\pm$ 17,3
Mistura 13	1208,3 <sup>b</sup> $\pm$ 48,2
Mistura 14	851,1 <sup>c</sup> $\pm$ 6,0
Mistura 15	1169,0 <sup>b</sup> $\pm$ 69,5
Mistura 16	843,4 <sup>c</sup> $\pm$ 10,3
Mistura 17	724,4 <sup>e</sup> $\pm$ 9,3
Mistura 18	1259,0 <sup>j</sup> $\pm$ 11,7

<sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j</sup> Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ( $p < 0.05$ ). Os resultados estão expressos em Médias  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=3$ .

\*Amostras utilizando a mesma mistura, mas com quantidades diferentes

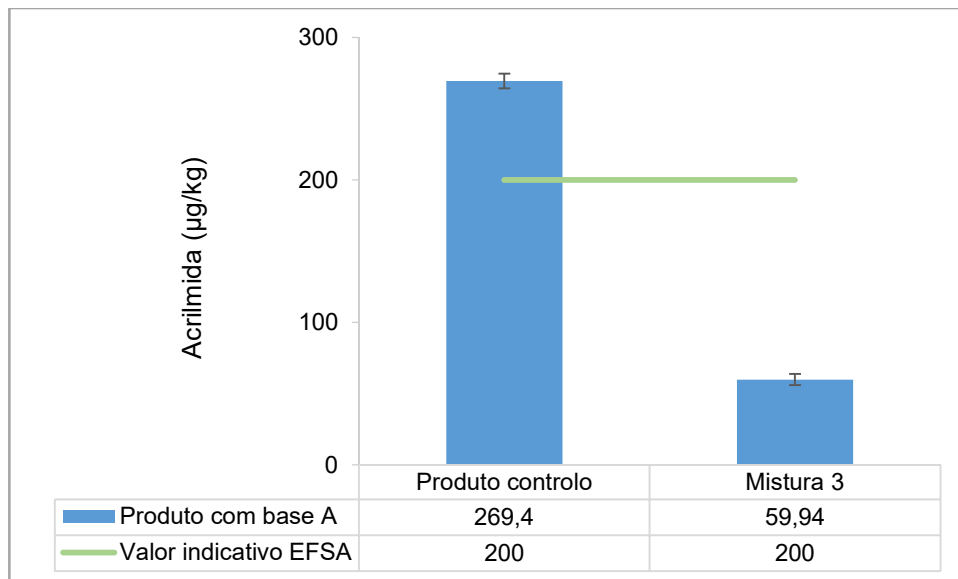
Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 4.12, pode constatar-se que as amostras de mistura 1, 13 e 15 são significativamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ), sendo que, o mesmo se observa com as amostra de mistura 2, 4, 12, 14, e 16.

Pode ainda verificar-se que não existem diferenças significativas entre as amostras de mistura 5 e 17, tal como também no caso das misturas 9 e 10; e 10 e 18. Contudo, estes quatro grupos são estatisticamente diferentes entre si, para  $p < 0,05$  pelo teste LSD.

Com base na Tabela 4.12, constatou-se que apenas uma mistura permite a redução da acrilamida, mistura 3, tendo-se obtido uma redução de 77,8%. Pode também afirmar-se que, as

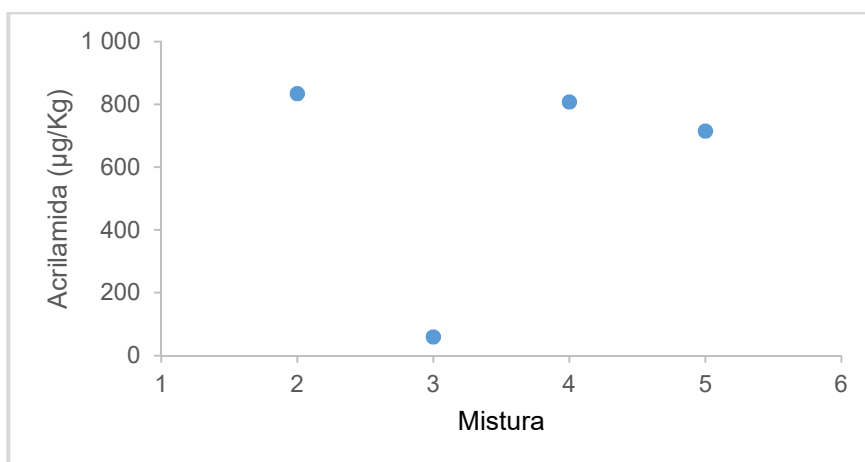
misturas 11, 18, 13 e 1, por essa ordem, contribuíram para um aumento da formação de acrilamida, contrariamente ao pretendido.

Uma vez que no produto de controlo foi encontrada uma concentração de 269,4 µg de acrilamida por kg de amostra, e esta se encontra acima do valor indicativo estabelecido pela EFSA, foi apenas comparado o produto da mistura 3 com o valor indicativo, Figura 4.9. Verifica-se então, que a mistura 3 tem a capacidade de reduzir a formação da acrilamida, ficando abaixo do valor indicativo, 200 µg/kg [27].



**Figura 4.9** Comparação dos resultados com a Farinha A e os valores indicativos da EFSA [27].

Uma vez que as amostras 2, 3, 4 e 5 contêm a mesma mistura mas em proporções diferentes, e dado que a quantidade da mesma vai aumentando sucessivamente, ou seja, 5>4>3>2, foi verificado se existia ou não uma relação entre a quantidade da mistura e a formação de acrilamida, Figura 4.10.



**Figura 4.10** Gráfico de dispersão das amostras de mistura 2,3,4 e 5.

Pela análise da Figura 4.10, não é visível uma relação entre a quantidade de mistura e o teor de acrilamida. Para uma análise mais correta foram efetuadas correlações lineares utilizando o coeficiente de correlação linear de Spearman ( $\rho$ ), Tabela 4.13.

**Tabela 4.13** Coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre as diferentes quantidades de aditivo (g) e o teor de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Parâmetros	Quantidade de mistura	Acrilamida
Quantidade de mistura	1,0	
Acrilamida	-0,4	1,0

Face aos resultados da Tabela 4.13, confirma-se o pressuposto anterior, não se verificando nenhuma correlação entre a quantidade de mistura e o teor de acrilamida, uma vez que, coeficiente de Spearman apresenta um valor baixo ( $\rho = -0,4$ ,  $p < 0,05$ ).

## Produto com base B

Identicamente ao produto com base A, foi confeccionado um produto de controlo com base B, de modo a ser possível identificar os produtos que reduzem a acrilamida. As misturas confeccionadas com a base B, são as mesmas que no estudo da base A.

Na Tabela 4.14 apresentam-se os resultados obtidos relativos às amostras de produto com base B, confeccionadas no INSA-DAN.

Constata-se que, na Tabela 4.14, a amostra de controlo de base B é significativamente semelhante à amostra da mistura 3, assim como as amostras 1 e 5; 2,7,10,14 e 15; 4,12,16,17 e 18; e 8, 9 e 13, pelo teste LSD ( $p > 0,05$ ).

Neste estudo observa-se que a mistura 3 contém o maior teor de acrilamida, sendo a única amostra que não manifestou redução do contaminante.

As amostras 18 e 16 destacam-se pela sua elevada percentagem de redução 78.7 % e 78.6%, respetivamente. As restantes amostras variam entre 50% e 78%. Estes valores de redução de acrilamida nos produtos confeccionados são superiores aos referidos na bibliografia [20, 21, 24, 44, 58, 90–92].

**Tabela 4.14** Resultados do teor de acrilamida no produto com base B

<b>Amostras</b>	<b>Acrilamida (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
Produto controlo	749,6 <sup>a</sup> $\pm$ 4,7
Mistura 1	326,0 <sup>b</sup> $\pm$ 6,2
Mistura 2*	209,5 <sup>c</sup> $\pm$ 14,2
Mistura 3*	751,3 <sup>a</sup> $\pm$ 3,5
Mistura 4*	168,3 <sup>d</sup> $\pm$ 12,9
Mistura 5*	319,4 <sup>b</sup> $\pm$ 10,2
Mistura 6	368,4 <sup>e</sup> $\pm$ 9,2
Mistura 7	205,4 <sup>c</sup> $\pm$ 18,4
Mistura 8	252,8 <sup>f</sup> $\pm$ 13,6
Mistura 9	278,3 <sup>f</sup> $\pm$ 20,3
Mistura 10	210,7 <sup>c</sup> $\pm$ 13,2
Mistura 11	216,2 <sup>c</sup> $\pm$ 17,2
Mistura 12	162,0 <sup>d</sup> $\pm$ 6,8
Mistura 13	253,0 <sup>f</sup> $\pm$ 21,3
Mistura 14	204,8 <sup>c</sup> $\pm$ 16,5
Mistura 15	201,5 <sup>c</sup> $\pm$ 13,1
Mistura 16	160,4 <sup>d</sup> $\pm$ 12,7
Mistura 17	176,9 <sup>d</sup> $\pm$ 16,6
Mistura 18	159,7 <sup>d</sup> $\pm$ 5,8

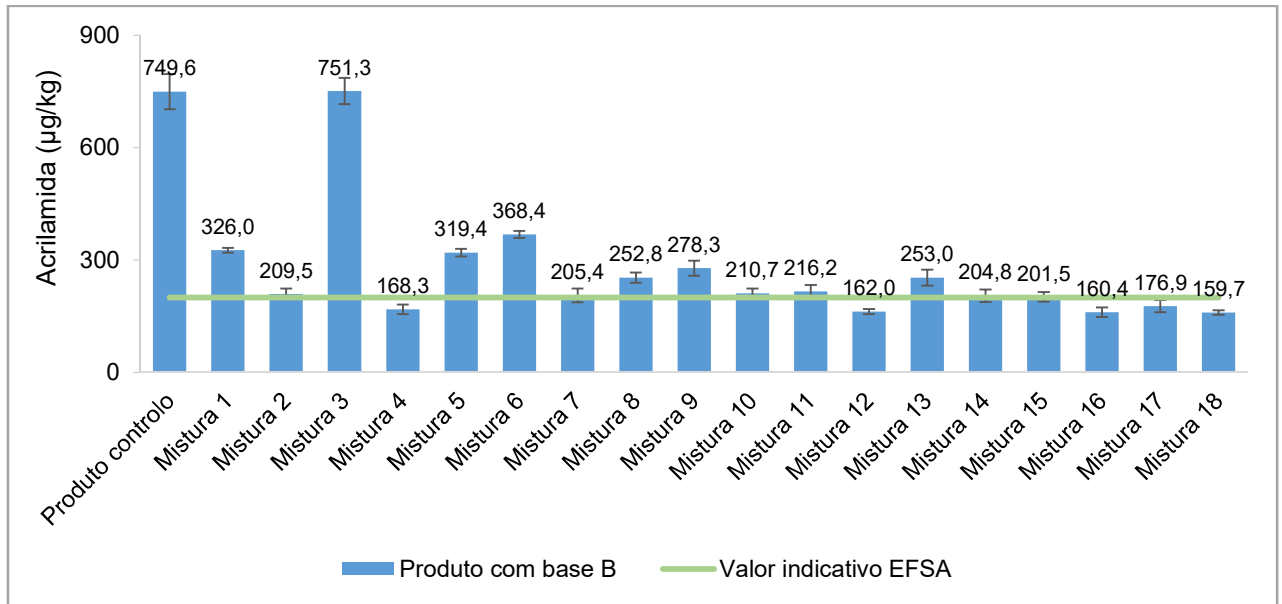
<sup>a,b,c,d,e,f</sup> Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ( $p < 0.05$ ). Os resultados estão expressos em Médias  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=3$ .

\*Amostras com mistura igual, mas peso de aditivo diferente

Perante os resultados obtidos, foi realizada a comparação entre estes e o valor indicativo da EFSA, 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Figura 4.11

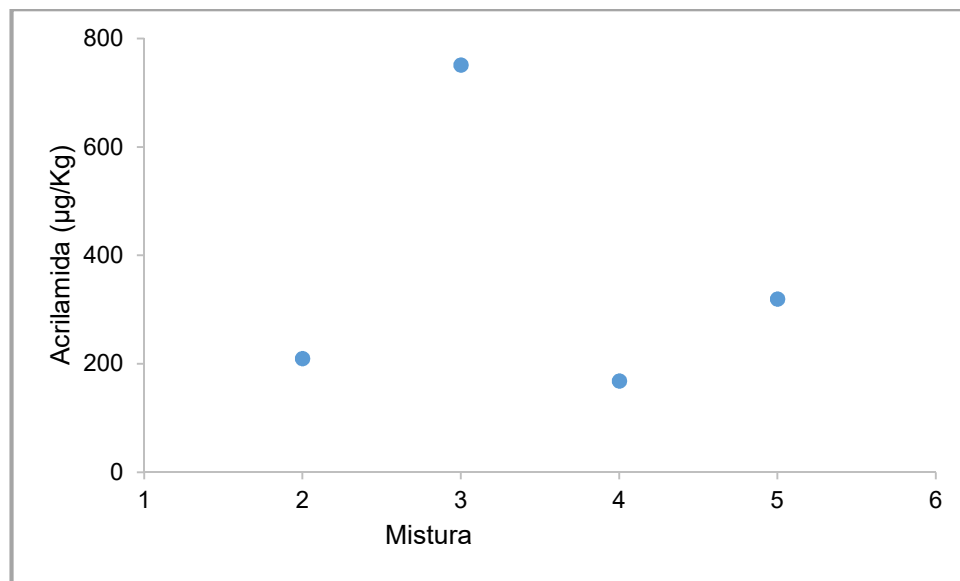
Observando a Figura 4.11, pode concluir-se que as misturas 4, 12, 16, e 18 se encontram abaixo do valor indicativo da EFSA. Verifica-se, ainda, que as amostras de mistura 2, 7, 10, 11, 14, 15 e 17 são as que possuem uma quantidade semelhante ao valor referido [27], podendo supor-se que aumentando a quantidade de mistura redutora, o resultado poderá ser menor do que o valor máximo da EFSA [27].

## Estratégias de redução e mitigação da acrilamida em produtos de panificação



**Figura 4.11** Comparação dos resultados com os valores indicativos da EFSA [27].

Tal como estudado no caso da base A, foi verificado para a base B se existia ou não uma relação entre a quantidade da mistura, 2, 3, 4 e 5, e a formação da acrilamida, Figura 4.12.



**Figura 4.12** Gráfico de dispersão das amostras de mistura 2,3,4 e 5 da base B.

Na Figura 4.12 verifica-se que não é visível uma relação entre a quantidade de mistura e a concentração de acrilamida.

Para uma análise mais correta, foi efetuada uma correlação linear utilizando o coeficiente de Spearman ( $\rho$ ), Tabela 4.15.

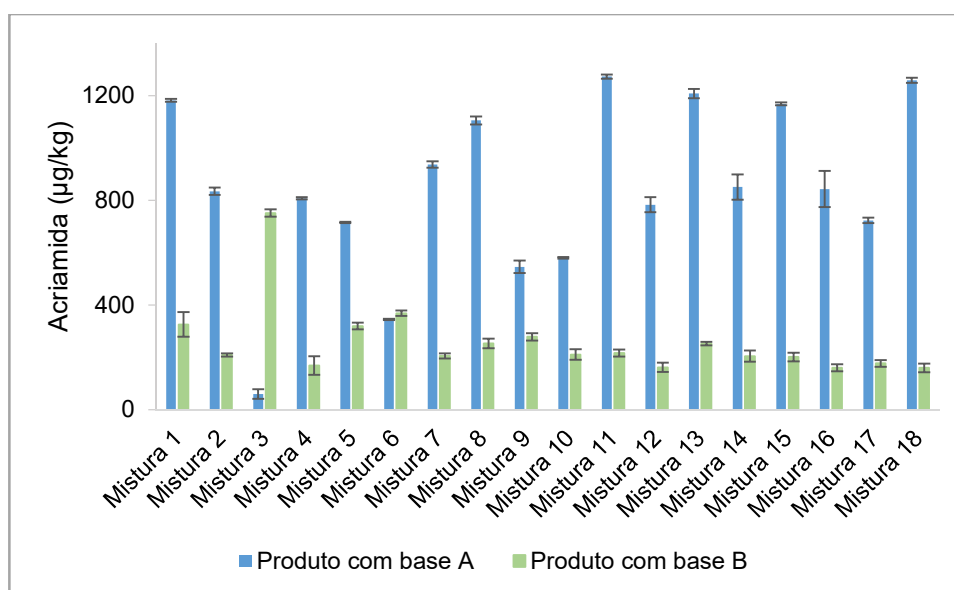
**Tabela 4.15** Coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre as diferentes quantidades de aditivo (g) e o teor de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Parâmetros	Quantidade de mistura	Acrilamida
Quantidade de mistura	1,0	
Acrilamida	0	1,0

Com base na Tabela 4.15, pode confirmar-se o pressuposto anterior, ou seja, não se verifica nenhuma correlação entre a quantidade de mistura e o teor de acrilamida, sendo o coeficiente de Spearman de 0 para  $p > 0,05$ .

## Comparação entre bases

Foi realizado um estudo de comparação dos resultados adquiridos nos dois estudos anteriores, Figura 4.13.

**Figura 4.13** Comparação de resultados das misturas da farinha A e B.

É possível apurar, pela Figura 4.13, que as misturas da base B possuem teores de acrilamida mais baixos do que no caso da base A.

Verifica-se ainda que a amostra de mistura 3 tem um comportamento diferente entre as duas bases, sendo que na base A se verificou uma redução de acrilamida, contrariamente ao caso da base B. Este comportamento pode estar relacionado com a composição nutricional de cada base.

Tal como mencionado anteriormente, em ambos os estudos da formulação de produtos de panificação ocorreram reduções mais elevadas do que as encontradas na literatura [20, 21, 24, 44, 58, 90–92].

### 4.3.2 Tempo de fermentação

Existem estudos quanto à relação do tempo de fermentação de massas de produtos de panificação e o teor de acrilamida no produto a consumir [93, 24], correspondendo esta a uma estratégia de redução possível de executar quer por parte do produtor como do consumidor [24]. Contudo, ainda não foram estudadas as várias espécies de bases existentes.

Por conseguinte, foi realizado um estudo sobre a relação do tempo de fermentação da massa do produto de base A e o teor de acrilamida no produto final, Tabela 4.16.

**Tabela 4.16** Resultados do teor de AA no produto com base A com diferentes tempos de fermentação

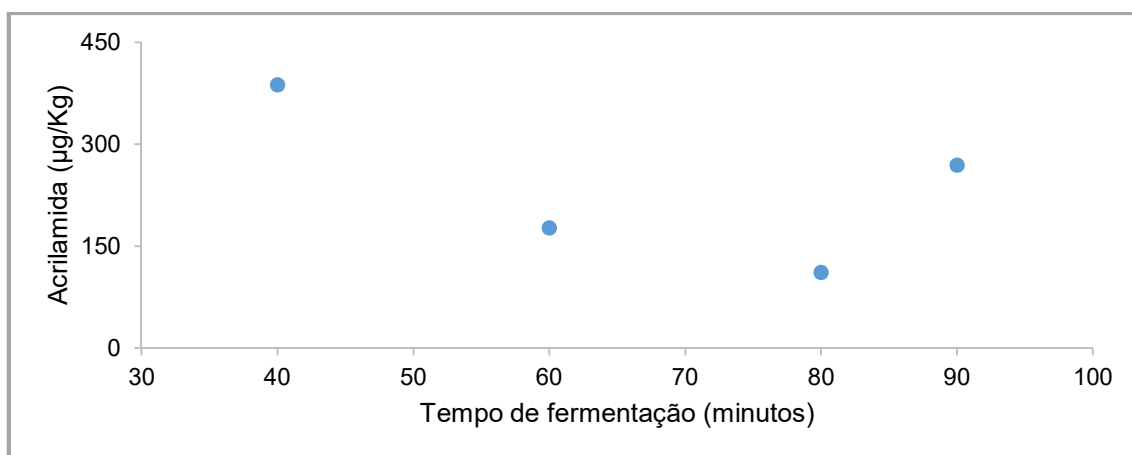
Amostras	Acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
40 minutos	387,8 <sup>a</sup> $\pm$ 26,9
60 minutos	177,1 <sup>b</sup> $\pm$ 4,8
80 minutos	111,7 <sup>c</sup> $\pm$ 4,1
90 minutos	269,4 <sup>d</sup> $\pm$ 5,2

<sup>a,b,c,d</sup> Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ( $p < 0.05$ ). Os resultados estão expressos em Médias  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=3$ .

Na Tabela 4.16, observa-se que todas as amostras são significativamente diferentes entre si. Os resultados adquiridos, não estão de acordo com a literatura, uma vez que existem estudos realizados por Claus *et al.*, Fredriksson *et al.*, Granby *et al.* e Mustafa *et al.* [94–97], que concluem que quanto maior o tempo de fermentação, menor será o teor de acrilamida no produto final.

Perante os teores de acrilamida referidos na Tabela 4.16 conclui-se que, a partir dos 90 minutos de fermentação, o teor de acrilamida aumenta, permitindo aferir que, o tempo de fermentação a utilizar é de 80 minutos, uma vez que este tempo permite a redução em 71% em relação aos 40 minutos. Porém, aumentar o tempo de fermentação de 40 minutos para 60 minutos, possibilita também uma elevada redução de acrilamida, 54%.

Foi ainda realizado um estudo de correlação entre o tempo de fermentação e o teor de acrilamida. Para isso, foi efetuado um gráfico de dispersão de forma a verificar se existe uma relação linear, Figura 4.14.



**Figura 4.14** Gráfico de dispersão do tempo de fermentação.

Segundo a literatura, seria de esperar que existisse uma relação entre o tempo de fermentação e a formação da acrilamida, em que, quanto maior o tempo de fermentação, menor seria a sua formação [94–97]. Pela análise da Figura 4.14, parece existir uma relação até aos 80 minutos, o que está de acordo com a literatura. Contudo, nos 90 minutos, essa relação deixa de existir, ocorrendo um aumento de acrilamida. Deste modo, para uma análise mais correta, foi feita uma correlação linear, utilizando o coeficiente de Spearman ( $\rho$ ), Tabela 4.17.

**Tabela 4.17** Coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre o tempo de fermentação (minutos) e o teor de AA ( $\mu\text{g/kg}$ )

Parâmetros	Tempo de Fermentação	Acrilamida
Tempo de Fermentação	1,0	
Acrilamida	0,2	1,0

Analisando a Tabela 4.17, conclui-se que não se verifica nenhuma correlação entre o tempo de fermentação e o teor de acrilamida ( $\rho = 0,2$ ,  $p < 0,05$ ).

Este resultado pode estar relacionado com o fato de no tempo de fermentação de 90 minutos o teor de acrilamida ser mais elevado do que no de 80 minutos.

Com o intuito de se verificar se existe relação entre os parâmetros estudados até aos 80 minutos, realizou-se novamente uma análise de correlação, excluindo os 90 minutos, Tabela 4.18.

**Tabela 4.18** Coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre o tempo de fermentação 40 a 80 minutos e o teor de AA ( $\mu\text{g/kg}$ )

Parâmetros	Tempo de Fermentação	Acrilamida
Tempo de Fermentação	1,0	
Acrilamida	-0.96	1,0

Pela análise do coeficiente de Spearman, verifica-se uma correlação fortemente negativa entre o tempo de fermentação até aos 80 minutos e a formação da acrilamida ( $\rho=-0,96$ ,  $p<0,05$ ). Este resultado está de acordo com a literatura [94–97]. Quanto maior o tempo de fermentação menor a formação de acrilamida no produto final. Contudo serão necessários mais estudos para se averiguar se o resultado está correto.



## 5. Conclusões e Proposta para trabalho futuro

Neste trabalho foi realizado um estudo de ocorrência de acrilamida em pastelaria e panificação, seguido da elaboração de possíveis estratégias de redução em produtos de panificação.

Procedeu-se, primeiramente, ao desenvolvimento e otimização do método analítico para a determinação e quantificação da acrilamida. Verificou-se que, ao utilizar a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detetor de matriz de fotodíodos, não foi possível obter uma separação satisfatória da acrilamida, uma vez que foram detetados interferentes da matriz no cromatograma. Posto isto, optou-se pela utilização do espectrómetro de massa, para o qual foi também necessário a otimização dos parâmetros deste. Perante a inexistência de interferentes de matriz no cromatograma adquirido, conclui-se que a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrómetro de massa é o método adequado para a deteção e quantificação do contaminante em estudo.

Através da análise global do estudo de ocorrência, constatou-se que o grupo das “Outras amostras” outras apresenta uma teor mais elevado, com 2286,43 µg/kg, sendo esta seguida dos grupos de Queques e pão (exceto trigo) com 833,35 µg/kg e 688,71 µg/kg, respetivamente. Para além disso, ao comparar os valores adquiridos neste estudo com os valores indicativos da EFSA, verificou-se que o valor de acrilamida nas bolachas húngaras e o pão se encontravam acima do valor referido. Como tal, procedeu-se a um estudo preliminar, no qual se adicionaram várias misturas ao produto de pastelaria de forma a reduzir o teor de acrilamida.

De entre os aditivos, apenas a mistura B apresentou redução do contaminante. Porém é fundamental a realização de mais estudos quanto ao efeito da mistura B na redução da AA, dado que a percentagem de redução obtida foi mínima.

Face ao elevado consumo de produtos de panificação na população portuguesa, decidiu-se desenvolver 18 misturas possíveis de reduzir a acrilamida. Para isso, foram utilizadas duas bases, A e B. No ensaio da base A, observou-se que somente a mistura 3 apresentou diminuição do teor do contaminante. Todas as outras misturas originaram maiores quantidades de acrilamida. Em oposição, as misturas realizadas com a base B, evidenciaram redução, exceto a mistura 3. As percentagens de reduções adquiridas nesta base foram de 50% a 79%. Estes resultados díspares entre bases podem dever-se à composição nutricional de cada uma, bem como à forma de confeção da receita com base A e B. Contudo, é crucial aprofundar esta questão.

Verificou-se, também, pelo teste de Spearman, que os resultados das misturas 2, 3, 4 e 5, nas duas bases, apresentavam uma relação linear muito fraca, ou mesmo nula, com o teor de acrilamida.

Concluiu-se que, com as taxas de redução obtidas, foi possível a diminuição da acrilamida em alguns produtos de panificação

Por fim, quanto à análise da relação da acrilamida com o aumento do tempo de fermentação da base A, observou-se que, aos 90 minutos, existe maior produção de acrilamida do que aos 80 minutos, o que vai contra os estudos existentes sobre o tempo de fermentação nos produtos de panificação. Contudo, foi possível verificar que ocorre redução de acrilamida entre os

40 e os 80 minutos, podendo concluir-se que, aos 80 minutos, ocorre a máxima redução do contaminante em estudo, podendo esta ser uma estratégia de redução a aplicar no produto de base A.

Em suma, neste trabalho, concluiu-se que no caso de estudo dos produtos de panificação, não é apenas importante as condições de processamento, mas também os parâmetros, como é o caso da qualidade da base utilizada, da formulação e condições de fermentação, entre outros. É necessário um estudo mais profundo em relação aos ingredientes que reduzem a acrilamida, uma vez que este campo ainda não foi totalmente desvendado, existindo ainda muitas contrariedades em vários estudos.

Este trabalho deu origem a apresentações em formato de poster num congresso internacional, International Conference on food contaminants e num congresso nacional, PortFIR 2015.

## **5.1 Proposta para trabalhos futuros**

Uma vez que ainda não existe muita informação em relação à ocorrência de acrilamida nos alimentos portugueses, seria interessante realizar mais estudos além dos grupos analisados neste trabalho.

Sendo a acrilamida um contaminante que se forma por reação de dois precursores, asparagina e açúcares redutores, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos para a deteção e identificação destes precursores.

Para além disso, perante os resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que é fundamental o estudo de mais estratégias de redução, bem como, a realização de mais testes em relação à formação de acrilamida durante a fermentação em diversas farinhas.

Para este contaminante torna-se relevante a realização de um estudo de exposição nacional, uma vez que até ao momento apenas existe um estudo para a cidade do Porto, não sendo este representativo da população portuguesa.

Por fim, seria interessante estudar a bioacessibilidade da acrilamida, dado à sua toxicidade.

## 6. Bibliografia

- [1] K. T. Visvanathan R, "Acrylamide in Food Products: A Review," *J. Food Process. Technol.*, vol. 05, no. 07, 2014.
- [2] H. Lingnert, S. Grivas, M. Jägerstad, K. Skog, M. Törnqvist, and P. Åman, "Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods," *Scand. J. Nutr.*, vol. 46, no. 4, pp. 159–172, 2002.
- [3] A. a. Elbashir, M. M. A. Omar, W. A. W. Ibrahim, O. J. Schmitz, and H. Y. Aboul-Enein, "Acrylamide Analysis in Food by Liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Methods," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 44, no. 2, pp. 107–141, 2014.
- [4] D. Borda and P. Alexe, "Acrylamide levels in food," vol. 1, no. 1, pp. 3–15, 2011.
- [5] M. Murkovic, "Acrylamide in Austrian foods," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 61, pp. 161–167, 2004.
- [6] I. N. Edith and E. M. Ochubiojo, "Food Quality Control : History , Present and Future," *Sci. Heal. Soc. Asp. Food Ind.*, 2012.
- [7] "World Health Organization: Trade, foreign, diplomacy and health." [Online]. Available: [https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Organiza%C3%A7%C3%A3o\\_das\\_Na%C3%A7%C3%B5es\\_Unidas\\_para\\_Alimenta%C3%A7%C3%A3o\\_e\\_Agricultura&action=edit](https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Organiza%C3%A7%C3%A3o_das_Na%C3%A7%C3%B5es_Unidas_para_Alimenta%C3%A7%C3%A3o_e_Agricultura&action=edit). [Acedido: 20-10-2015].
- [8] Efsa, "European Food Safety Authority. Contaminants in food and feed Mycotoxins." 2012.
- [9] D. Pacetti, E. Gil, N. G. Frega, L. Álvarez, P. Dueñas, A. Garzón, and P. Lucci, "Acrylamide levels in selected Colombian foods," *Food Addit. Contam. Part B*, vol. 8, no. 2, pp. 99–105, 2015.
- [10] J. E. Klaunig, "Acrylamide carcinogenicity," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, pp. 5984–5988, 2008.
- [11] S. Opinion, "Scientific Opinion," pp. 1–10, 2010.
- [12] M. W. Pariza, J. Coughlin, C. Davies, F. Sciences, B. Kettlitz, L. P. Robin, A. Nutrition, U. S. Food, D. Schmidt, F. I. Council, J. Scimeca, R. Stadler, N. P. Technol-, L. A. Zetterberg, A. Zetterberg, N. F. Adminis-, H. Kim, D. Ad-, F. Safety, F. Science, H. Nutrition, and I. State, "a Crylamide in F Ood," *Science (80-. )*, no. April 2002, 2006.
- [13] L. Hagmar, M. Törnqvist, C. Nordander, I. Rosén, M. Bruze, a. Kautiainen, a. L. Magnusson, B. Malmberg, P. Aprea, F. Granath, and a. Axmon, "Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose," *Scand. J. Work. Environ. Heal.*, vol. 27, no. 4, pp. 219–226, 2001.
- [14] R. M. LoPachin, "The changing view of acrylamide neurotoxicity," *Neurotoxicology*, vol. 25, no. 4 SPEC. ISS., pp. 617–630, 2004.
- [15] A. Besaratinia and G. P. Pfeifer, "A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity," *Carcinogenesis*, vol. 28, no. 3, pp. 519–528, 2007.
- [16] W. Parzefall, "Minireview on the toxicity of dietary acrylamide," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, no. 4, pp. 1360–1364, 2008.

- [17] J. M. Rice, "The carcinogenicity of acrylamide," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 580, no. 1–2, pp. 3–20, 2005.
- [18] a. Papadopoulos, I. Sioen, F. Cubadda, H. Ozer, H. I. Oktay Basegmez, a. Turrini, M. T. Lopez Esteban, P. M. Fernandez San Juan, D. Sokolić-Mihalak, M. Jurkovic, S. De Henauw, F. Aureli, K. Vin, and V. Sirot, "TDS exposure project: Application of the analytic hierarchy process for the prioritization of substances to be analyzed in a total diet study," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 76, pp. 46–53, 2015.
- [19] I. S. Arvanitoyannis and N. Dionisopoulou, "Acrylamide: Formation, Occurrence in Food Products, Detection Methods, and Legislation," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 54, no. 6, pp. 708–733, 2013.
- [20] T. M. Amrein, L. Andres, F. Escher, and R. Amadó, "Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options.," *Food Addit. Contam.*, vol. 24 Suppl 1, no. March 2015, pp. 13–25, 2007.
- [21] Y. Xu, B. Cui, R. Ran, Y. Liu, H. Chen, G. Kai, and J. Shi, "Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 69, pp. 1–12, 2014.
- [22] Y. Zhang and Y. Zhang, "Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge.," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 47, no. 5, pp. 521–542, 2007.
- [23] T. Wenzl, D. W. Lachenmeier, and V. Gökmen, "Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 389, no. 1, pp. 119–137, 2007.
- [24] J. Keramat, A. LeBail, C. Prost, and M. Jafari, "Acrylamide in Baking Products: A Review Article," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 4, no. 4, pp. 530–543, 2011.
- [25] Y. Liu, P. Wang, F. Chen, Y. Yuan, Y. Zhu, H. Yan, and X. Hu, "Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination," *Food Chem.*, vol. 186, pp. 46–53, 2015.
- [26] V. a Yaylayan, C. P. Locas, A. Wnorowski, and J. O'Brien, "Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 561, pp. 191–203, 2005.
- [27] Efsa, "Scientific Opinion on Lead in Food," *EFSA J.*, vol. 8, no. 4, p. 1570, 2010.
- [28] E. Dybing, P. B. Farmer, M. Andersen, T. R. Fennell, S. P. D. Lalljie, D. J. G. Müller, S. Olin, B. J. Petersen, J. Schlatter, G. Scholz, J. a. Scimeca, N. Slimani, M. Törnqvist, S. Tuijtelaars, and P. Verger, "Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 43, no. 3, pp. 365–410, 2005.
- [29] R. D. A. Comissão, "12.11.2013," vol. 10, no. 2012, pp. 2012–2014, 2013.
- [30] C. M. D. Soares, "Assessment of the dietary intake of acrylamide in Portugal . Development and evaluation of strategies for reduction of acrylamide formation in thermally processed foods," 2015.
- [31] "Portal do Instituto Nacional de Estatística." [Online]. Available: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=00002](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=00002)

- 13&contexto=bd&selTab=tab2. [Acedido: 25-9-2015].
- [32] F. S. Agency, "Acrylamide in the home: Home-cooking practices and acrylamide formation."
- [33] T. Y. Curtis, J. Postles, and N. G. Halford, "Reducing the potential for processing contaminant formation in cereal products," *J. Cereal Sci.*, vol. 59, no. 3, pp. 382–392, 2013.
- [34] R. V. Hedegaard, K. Granby, H. Frandsen, J. Thygesen, and L. H. Skibsted, "Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 227, no. 2, pp. 519–525, 2008.
- [35] D. Kalita and S. S. Jayanty, "Reduction of acrylamide formation by vanadium salt in potato French fries and chips," *Food Chem.*, vol. 138, no. 1, pp. 644–649, 2013.
- [36] L. Marková, Z. Ciesarová, K. Kukurová, H. Zieliński, M. Przygodzka, A. Bednáriková, and P. Šimko, "Influence of various spices on acrylamide content in buckwheat ginger cakes," *Chem. Pap.*, vol. 66, no. September 2011, pp. 949–954, 2012.
- [37] F. Morales, E. Capuano, and V. Fogliano, "Mitigation strategies to reduce acrylamide formation in fried potato products," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1126, pp. 89–100, 2008.
- [38] Y. Zhang, G. Zhang, and Y. Zhang, "Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments," *J. Chromatogr. A*, vol. 1075, no. 1–2, pp. 1–21, 2005.
- [39] Y. Zhang and Y. Zhang, "Study on reduction of acrylamide in fried bread sticks by addition of antioxidant of bamboo leaves and extract of green tea," *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, vol. 16, no. SUPPL.1, pp. 131–136, 2007.
- [40] "FoodDrinkEurope Acrylamide Toolbox 2013," no. January, 2014.
- [41] N. G. Halford, N. Muttucumaru, T. Y. Curtis, and M. a J. Parry, "Genetic and agronomic approaches to decreasing acrylamide precursors in crop plants.," *Food Addit. Contam.*, vol. 24 Suppl 1, no. November, pp. 26–36, 2007.
- [42] J. S. Elmore, a. T. Dodson, N. Muttucumaru, N. G. Halford, M. a J. Parry, and D. S. Mottram, "Effects of sulphur nutrition during potato cultivation on the formation of acrylamide and aroma compounds during cooking," *Food Chem.*, vol. 122, no. 3, pp. 753–760, 2010.
- [43] E. Bråthen, A. Kita, S. H. Knutsen, and T. Wicklund, "Addition of glycine reduces the content of acrylamide in cereal and potato products.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 8, pp. 3259–3264, 2005.
- [44] T. M. Amrein, B. Schönbacher, F. Escher, and R. Amadò, "Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 13, pp. 4282–4288, 2004.
- [45] D. Li, Y. Chen, Y. Zhang, B. Lu, C. Jin, X. Wu, and Y. Zhang, "Study on Mitigation of Acrylamide Formation in Cookies by 5 Antioxidants," *J. Food Sci.*, vol. 77, no. 11, 2012.
- [46] T. K. Palazoglu and V. Gökmen, "Reduction of acrylamide level in french fries by employing a temperature program during frying.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 15,

pp. 6162–6, 2008.

- [47] T. De Wilde, B. De Meulenaer, F. Mestdagh, Y. Govaert, W. Ooghe, S. Fraselle, K. Demeulemeester, C. Van Peteghem, A. Calus, J. M. Degroodt, and R. Verhé, "Selection criteria for potato tubers to minimize acrylamide formation during frying," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 6, pp. 2199–2205, 2006.
- [48] S. Urbančič, M. H. Kolar, D. Dimitrijević, L. Demšar, and R. Vidrih, "Stabilisation of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato with rosemary extract during deep-fat frying," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 57, no. 2, pp. 671–678, 2014.
- [49] G. Morales, M. Jimenez, O. Garcia, M. R. Mendoza, and C. I. Beristain, "Effect of natural extracts on the formation of acrylamide in fried potatoes," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 58, no. 2, pp. 587–593, 2014.
- [50] E. Koklamaz, T. K. Palazoğlu, T. Kocadağlı, and V. Gökmen, "Effect of combining conventional frying with radio-frequency post-drying on acrylamide level and quality attributes of potato chips," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94, no. 10, pp. 2002–2008, 2014.
- [51] K. Miśkiewicz, E. Nebesny, and J. Oracz, "Formation of Acrylamide During Baking of Shortcrust Cookies Derived from Various Flours," vol. 30, no. 1, pp. 53–66, 2012.
- [52] Q. Ni, Y. Zhang, G. Xu, Q. Gao, L. Gong, and Y. Zhang, "Influence of harvest season and drying method on the antioxidant activity and active compounds of two bamboo grass leaves," *J. Food Process. Preserv.*, vol. 38, no. 4, pp. 1565–1576, 2014.
- [53] R. C. Alves, "Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length," *Food Chem.*, vol. 119, no. 3, pp. 929–934, 2010.
- [54] M. Banchemo, G. Pellegrino, and L. Manna, "Supercritical fluid extraction as a potential mitigation strategy for the reduction of acrylamide level in coffee," *J. Food Eng.*, vol. 115, no. 3, pp. 292–297, 2013.
- [55] M. Anese, B. Quarta, and J. Frias, "Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits," *Food Chem.*, vol. 126, no. 2, pp. 435–440, 2011.
- [56] F. Pedreschi, K. Kaack, and K. Granby, "The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries," *Food Chem.*, vol. 109, no. 2, pp. 386–392, 2008.
- [57] F. Pedreschi, S. Mariotti, K. Granby, and J. Risum, "Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 6, pp. 1473–1476, 2011.
- [58] M. Anese, M. Suman, and M. C. Nicoli, "Acrylamide removal from heated foods," *Food Chem.*, vol. 119, no. 2, pp. 791–794, 2010.
- [59] O. Kaplan, G. Kaya, C. Ozcan, M. Ince, and M. Yaman, "Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry," *Microchem. J.*, vol. 93, no. 2, pp. 173–179, 2009.
- [60] A. A. Elbashir, M. M. A. Omar, W. A. W. Ibrahim, O. J. Schmitz, and H. Y. Aboul-Enein, "Acrylamide Analysis in Food by Liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Methods," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 44, no. 2, pp. 107–141, Apr. 2014.
- [61] J. Oracz, E. Nebesny, and D. Zyżelewicz, "New trends in quantification of acrylamide in

- food products.,” *Talanta*, vol. 86, pp. 23–34, Oct. 2011.
- [62] “Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs.” [Online]. Available: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf020302f>. [Acedido: 09-10-2015].
- [63] Q. Hu, X. Xu, Y. Fu, and Y. Li, “Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review,” *Food Control*, vol. 56, pp. 135–146, 2015.
- [64] A. Pittet, A. Périsset, and J. M. Oberson, “Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1035, no. 1, pp. 123–130, 2004.
- [65] C. Soares, S. Cunha, and J. Fernandes, “Determination of acrylamide in coffee and coffee products by GC-MS using an improved SPE clean-up.,” *Food Addit. Contam.*, vol. 23, no. 12, pp. 1276–1282, 2006.
- [66] V. Gökmen, H. Z. Şenyuva, J. Acar, and K. Sarioğlu, “Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1088, no. 1–2, pp. 193–199, 2005.
- [67] J. Rosén, A. Nyman, and K.-E. Hellenäs, “Retention studies of acrylamide for the design of a robust liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for food analysis.,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1172, no. 1, pp. 19–24, 2007.
- [68] C. Gertz and S. Klostermann, “Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 104, no. 11, pp. 762–771, 2002.
- [69] H. Wang, F. Feng, Y. Guo, S. Shuang, and M. M. F. Choi, “HPLC-UV quantitative analysis of acrylamide in baked and deep-fried Chinese foods,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 31, no. 1, pp. 7–11, 2013.
- [70] Y. Zhang, H. Fang, and Y. Zhang, “Study on formation of acrylamide in asparagine-sugar microwave heating systems using UPLC-MS/MS analytical method,” *Food Chem.*, vol. 108, no. 2, pp. 542–550, 2008.
- [71] S. T. J. L. Ehotay, “Rapid Sample Preparation Method for LC-MS MS or GC-MS analysis of Acrylamides in Various food matrices 2006 GD.pdf,” 2006.
- [72] K. Bagdonaite, K. Derler, and M. Murkovic, “Determination of acrylamide during roasting of coffee,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 15, pp. 6081–6086, 2008.
- [73] M. Biziuk, “Solid Phase Extraction Technique – Trends , Opportunities and Applications,” *Polish J. Environ. Stud.*, vol. 15, no. 5, pp. 677–690, 2006.
- [74] Supelco, “Guide to Solid Phase Extraction - bulletin 910,” p. -, 1998.
- [75] P. C. Vieira, “1. Classificação pela forma física do sistema cromatográfico,” *Quim. Nova*, vol. 7, no. 7, pp. 21–25, 1998.
- [76] B. Srivastava, B. K. Sharma, U. Singh Baghel, and N. Sethi, “Ultra Performance Liquid Chromatography (Uplc) : a Chromatography Technique,” *Int. J. Pharm. Qual. Assur.*, vol. 2, no. 1, pp. 19–25, 2010.
- [77] M. Swartz, “Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction,” *Sep. Sci. Re-Defined, LCGC ...*, vol. 586, no. May, pp. 8–14, 2005.
- [78] R. V. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 2010.

- [79] Agilent Technologies, "Basics of LC/MS," pp. 1–36, 2001.
- [80] A. E. M. Crotti, R. Vessecchi, J. L. C. Lopes, and N. P. Lopes, "Espectrometria de massas com ionização por 'Electrospray': Processus químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular," *Quim. Nova*, vol. 29, no. 2, pp. 287–292, 2006.
- [81] Y. Y. Zhang, J. Jiao, Z. Cai, and Y. Ren, "An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1142, no. 2, pp. 194–198, Feb. 2007.
- [82] K. Svensson, L. Abramsson, W. Becker, a. Glynn, K. E. Hellenäs, Y. Lind, and J. Rosén, "Dietary intake of acrylamide in Sweden," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, no. 11, pp. 1581–1586, 2003.
- [83] K. Hoenicke, R. Gatermann, W. Harder, and L. Hartig, "Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 520, no. 1–2, pp. 207–215, 2004.
- [84] F. Pedreschi, M. S. Mariotti, and K. Granby, "Current issues in dietary acrylamide: Formation, mitigation and risk assessment," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94, no. 1, pp. 9–20, 2014.
- [85] L. Marková, Z. Ciesarová, K. Kukurová, H. Zieliński, M. Przygodzka, A. Bednáriková, and P. Šimko, "Influence of various spices on acrylamide content in buckwheat ginger cakes," *Chem. Pap.*, 2012.
- [86] E. J. M. Konings, a. J. Baars, J. D. Van Klaveren, M. C. Spanjer, P. M. Rensen, M. Hiemstra, J. a. Van Kooij, and P. W. J. Peters, "Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, no. 11, pp. 1569–1579, 2003.
- [87] T. Wenzl and E. Anklam, "European Union database of acrylamide levels in food: update and critical review of data collection.," *Food Addit. Contam.*, vol. 24 Suppl 1, no. June 2015, pp. 5–12, 2007.
- [88] J. Bassama, P. Brat, P. Bohuon, R. Boulanger, and Z. Günata, "Study of acrylamide mitigation in model system: Effect of pure phenolic compounds," *Food Chem.*, vol. 123, no. 2, pp. 558–562, 2010.
- [89] C. Jin, X. Wu, and Y. Zhang, "Relationship between antioxidants and acrylamide formation: A review," *Food Res. Int.*, vol. 51, no. 2, pp. 611–620, 2013.
- [90] R. a. Levine and R. E. Smith, "Sources of variability of acrylamide levels in a cracker model," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 11, pp. 4410–4416, 2005.
- [91] A. Claus, M. Mongili, G. Weisz, A. Schieber, and R. Carle, "Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls," *J. Cereal Sci.*, vol. 47, no. 3, pp. 546–554, 2008.
- [92] A. Claus, M. Mongili, G. Weisz, A. Schieber, and R. Carle, "Impact of formulation and

- technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls,” *J. Cereal Sci.*, vol. 47, no. 3, pp. 546–554, 2008.
- [93] H. Fredriksson, J. Tallving, J. Rosén, and P. Åman, “Fermentation reduces free asparagine in dough and acrylamide content in bread,” *Cereal Chem.*, vol. 81, no. 5, pp. 650–653, 2004.
- [94] K. Granby, N. J. Nielsen, R. V Hedegaard, T. Christensen, M. Kann, and L. H. Skibsted, “Acrylamide-asparagine relationship in baked/toasted wheat and rye breads.,” *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, vol. 25, no. 8, pp. 921–929, 2008.
- [95] A. Mustafa, M. Fink, A. Kamal-Eldin, J. Rosén, R. Andersson, and P. Åman, “Interaction effects of fermentation time and added asparagine and glycine on acrylamide content in yeast-leavened bread,” *Food Chem.*, vol. 112, no. 4, pp. 767–774, 2009.



## 7. Anexos

### Anexo A – Identificação das amostras de ocorrência

#### Amostras de pastelaria

Tabela A. 1 Identificação das amostras de pastelaria

Amostra		
Queques	Queque de chocolate	
	Queque de Amêndoa	
	Queque de Aveia	
	Queque Simples	
Bolachas	Húngaros	
	Crocantes de Cacau	
	Apertados	
	Caramelo	
	Gregos	
Pastéis	Pastel de nata	Inteiro
		Creme
		Massa
	Pastel de bolota	Inteiro
		Creme
		Massa
	Pastel de Chicharo	
Outras	Torta de Coco	
	Torta de Laranja	
	Folhado Misto	
	Bolo de Coco	
	Trouxa Filo	
	Pão de Deus	

## Amostras de panificação

Tabela A. 2 Identificação das amostras de panificação

Amostra	
Pão	Broa
	Baguete
	Baguete Integral
	Pão Cereais
	Pão
	Pão Centeio
	Bola
	Pão tremçoço
	Pão Azeitonas e Nozes
	Pão Canela
	Pão Azeitonas
	Pão Coco
Pão Beterraba	

**Anexo B – Análise de variância do estudo de ocorrência****Pastelaria****Tabela B. 1** ANOVA para a determinação de AA realizadas às amostras de pastelaria

Fonte de variação	SS	g.l.	MS	F0	Sig. (p)
<b>Queques</b> Entre variedades	215021	3	71674	482,00	0,00
Erro (interior)	595	4	149		
Total	215616	7			
<b>Bolachas</b> Entre variedades	893642	4	223411	276,693	0,000
Erro (interior)	4037	5	807		
Total	897679	9			
<b>Pastéis</b> Entre variedades	518944	6	86491	365,32	0,000
Erro (interior)	1657	7	237		
Total	520601	13			
<b>Outras</b> Entre variedades	23703519	5	4740704	537,988	0,000
Erro (interior)	52871	6	8812		
Total	23756390	11			

Onde,

SS – Soma dos quadrados

g.l – Graus de liberdade

MS – Quadrados médios

F<sub>0</sub> – Distribuição de Fisher

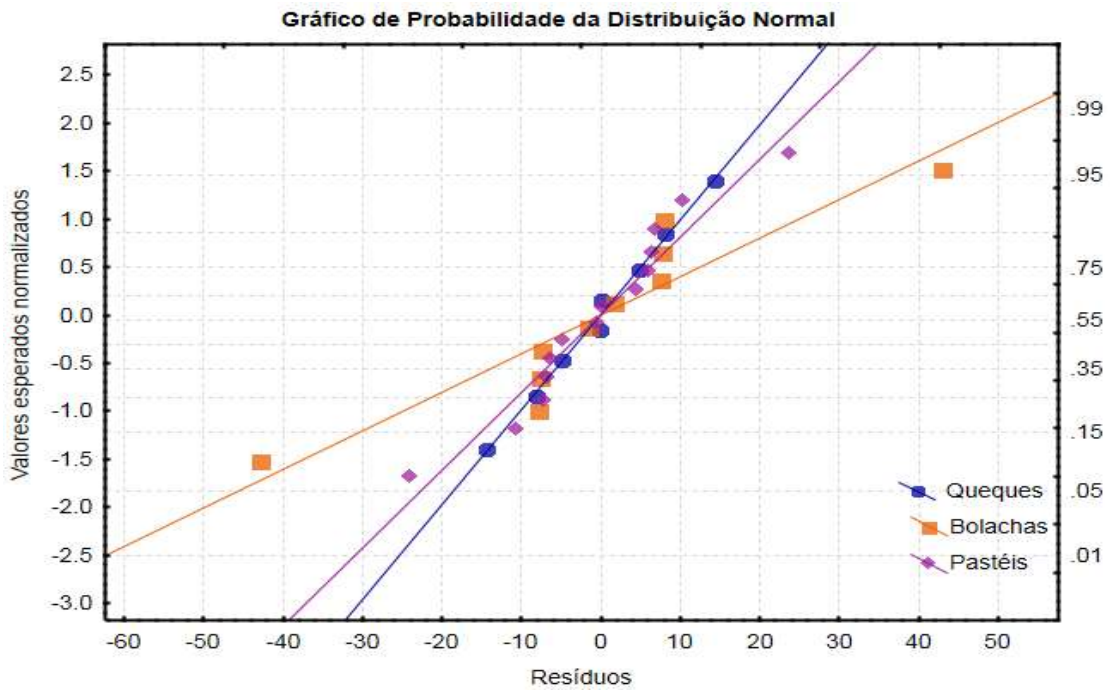
Sig. (p) - p-value, nível de significância

Pela análise da ANOVA, Tabela B.1, pode concluir-se que existem diferenças significativas para  $p < 0,05$  entre as diversos grupos de amostras. Como tal, recorreu-se ao teste da menor diferença significativa (LSD) de modo a se determinar quais as variedades que apresentavam diferenças significativas entre si, Tabela B.2. Nesta tabela está exemplificado como se procedeu para as restantes amostras.

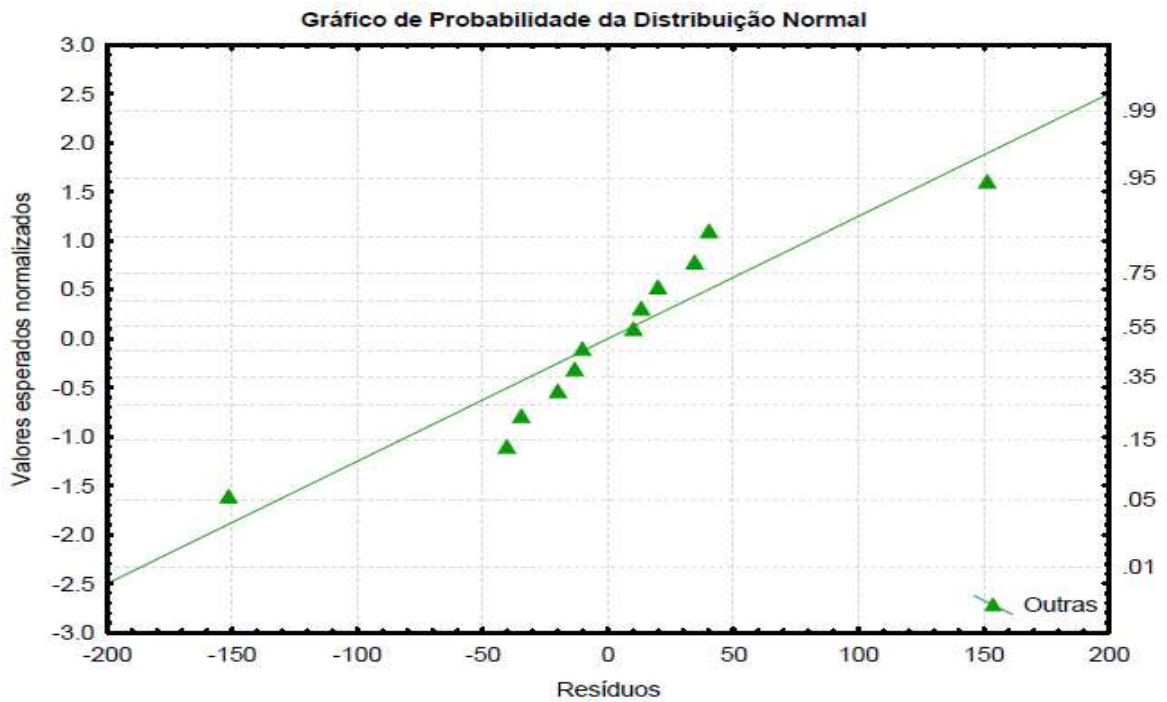
**Tabela B. 2** Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD

Amostras	Amostra (A)	Amostra (B)	Diferença entre médias ( $ \bar{A} - \bar{B} $ )	Sig. (p)
Queques	Chocolate	Amêndoa	135*	0,000
		Aveia	380*	0,000
		Simples	381,66*	0,000
	Amêndoa	Aveia	245,69*	0,000
		Simples	246,63*	0,000
		Aveia	Simples	0,94

\*As diferenças entre as médias são significativamente diferentes para  $p < 0,05$

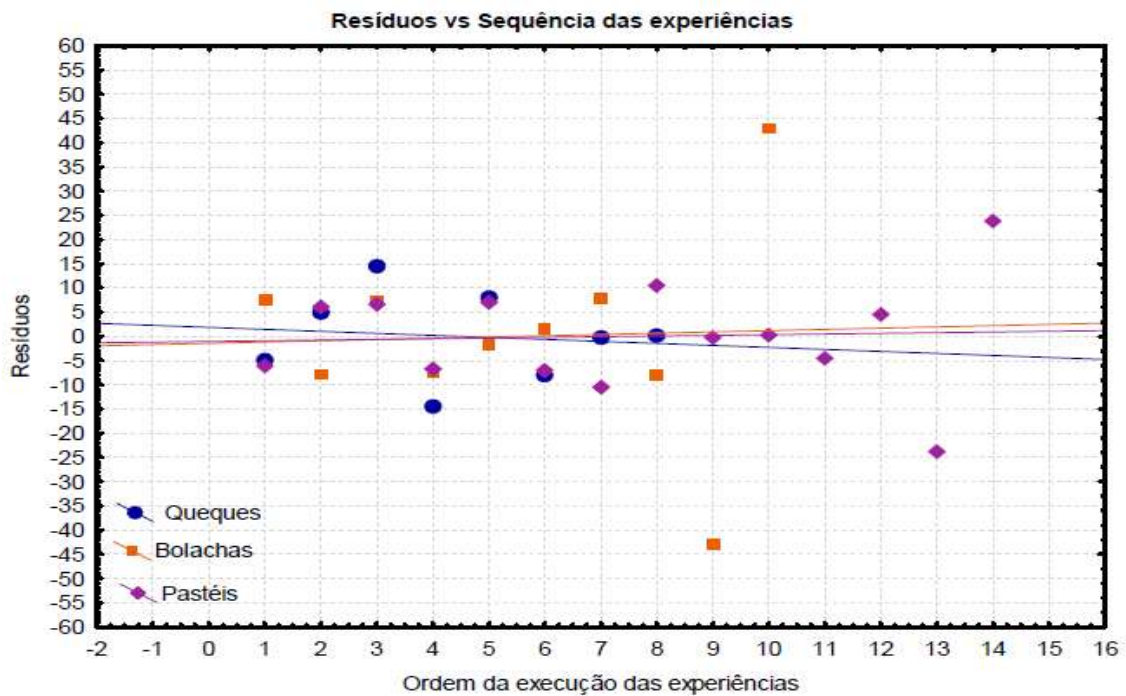


**Figura B. 1** Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras de queques, bolachas e pastéis.

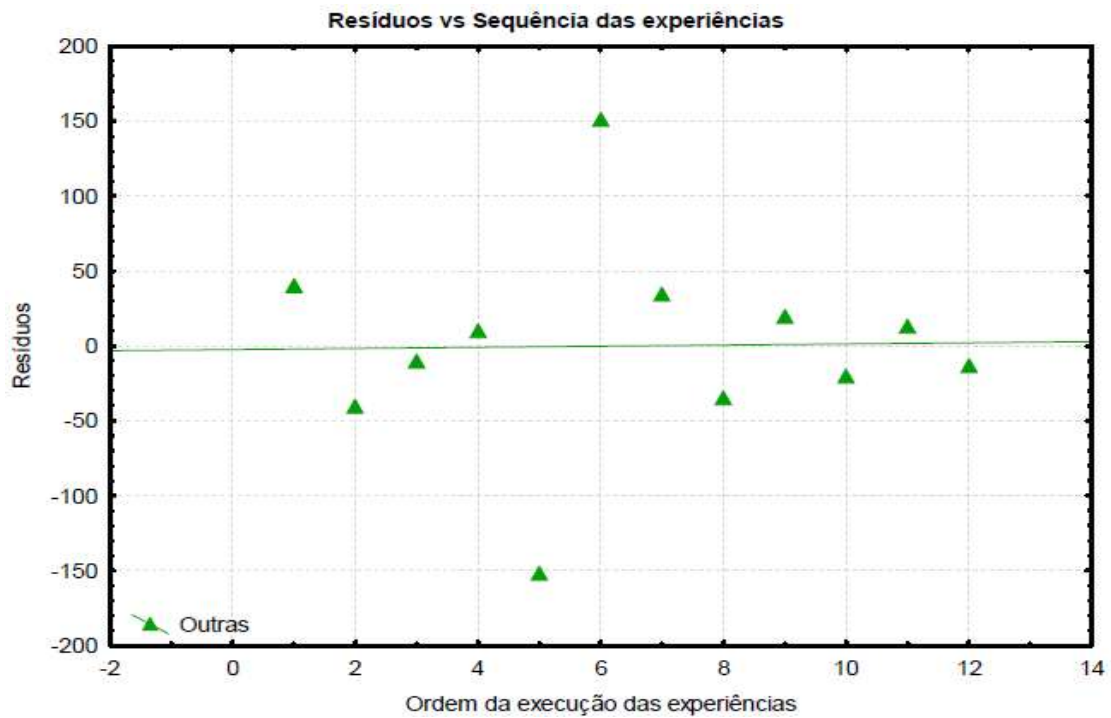


**Figura B. 2** Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras Outras.

Os gráficos anteriores (Figura B.1 e Figura B.2) indicam que o pressuposto da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras de Queques, bolachas, pastéis e Outras é satisfeito, uma vez que os resíduos se dispõem à volta da reta, não indicando uma violação dos pressupostos.

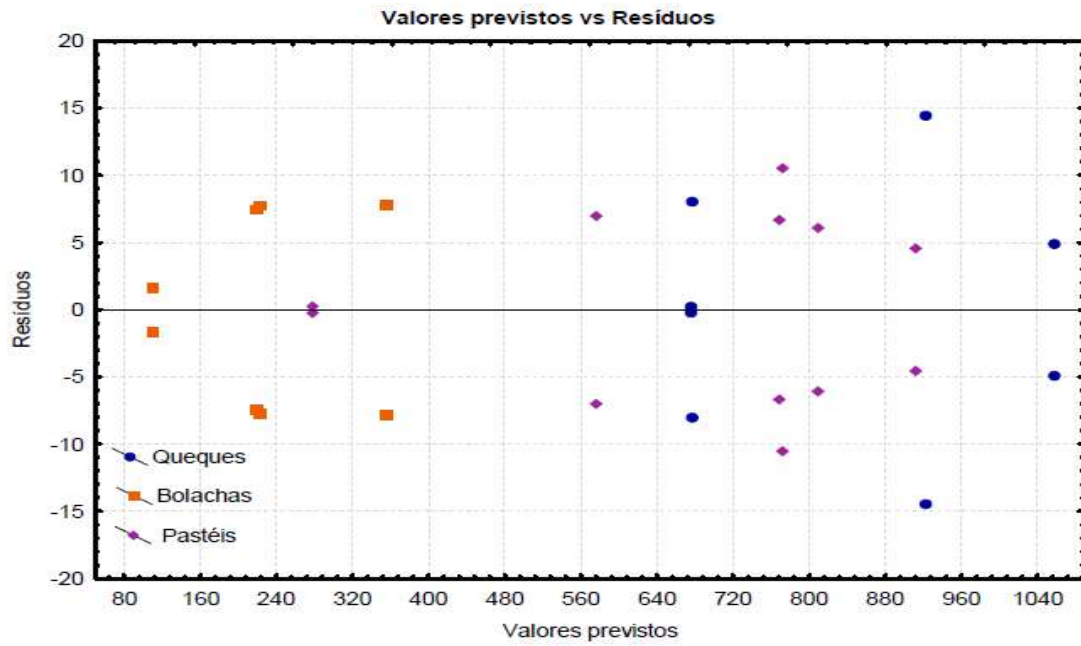


**Figura B. 3** Verificação da independência para a determinação de acrilamida nas amostras de queques, bolachas e pastéis.

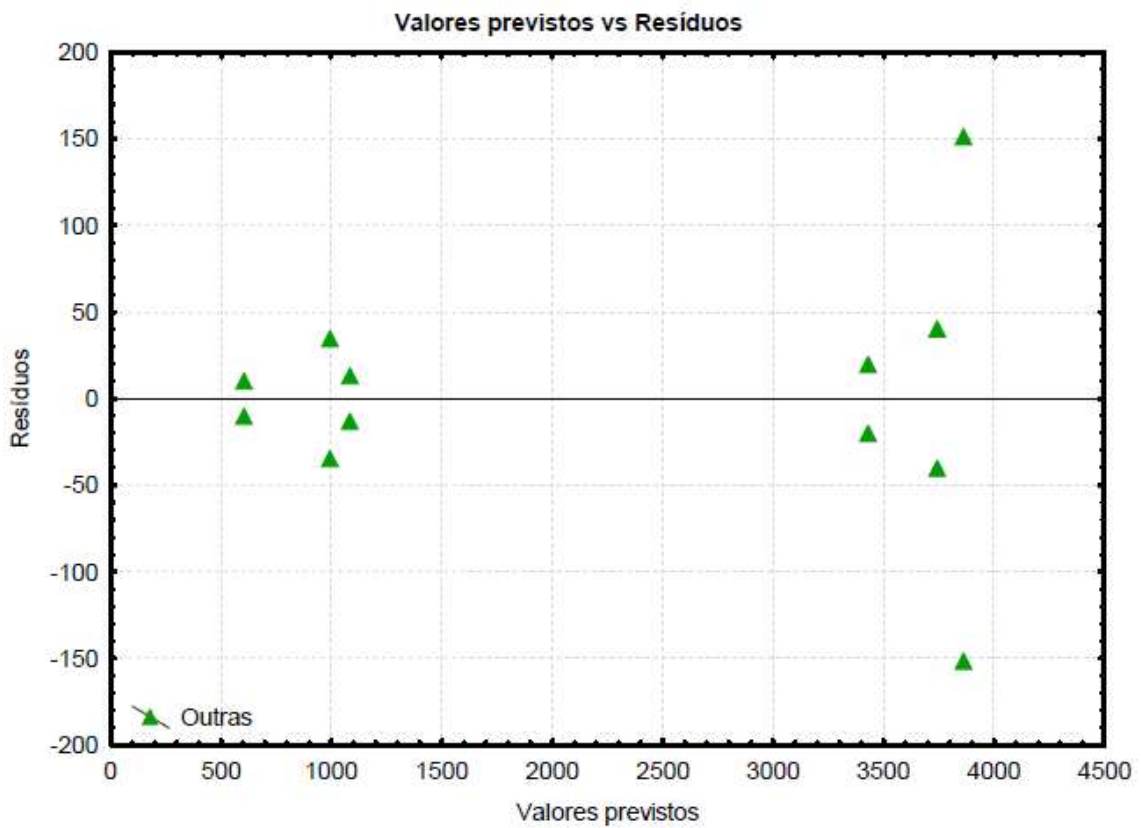


**Figura B. 4** Verificação da independência para a determinação de acrilamida nas amostras Outras.

Os gráficos dos resíduos em função da ordem aleatória de execução das experiências (Figura B.3 e Figura B.4) parecem mostrar violação de pressupostos na determinação de acrilamida, uma vez que se verifica tendências especiais na disposição dos resíduos. No entanto, assume-se que não existe violação, uma vez que a dimensão da amostra é muito pequena, o que impossibilita de tirar conclusões concretas, ficando estas em causa.



**Figura B. 5** Verificação da homogeneidade da variância na determinação da acrilamida nas amostras de queques, bolachas e pastéis.



**Figura B. 6** Verificação da homogeneidade da variância na determinação da acrilamida nas amostras Outras.

Os gráficos anteriores (Figura B.5 e Figura B.6) parecem indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância, uma vez que apresentam uma estrutura especial, no entanto, mais uma vez é relevante o facto de a dimensão da amostra ser muito pequena o que conduz a um resultado inconclusivo. Como tal, recorreu-se ao teste de Levene, onde se obteve resultados concordantes com o parecer anterior, com a exceção das amostras de queques, sendo assim verifica-se uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância apenas nas amostras de bolachas, pastéis e outras.

**Pão****Tabela B. 3** ANOVA para a determinação de AA realizadas às amostras de pão

Fonte de variação		SS	g.l.	MS	F0	Sig. (p)
Pão	Entre variedades	5240023	12	436669	1027,82	0,000
	Erro (interior)	11046	26	425		
	Total	5251069	38			

Onde,

SS – Soma dos quadrados

g.l – Graus de liberdade

MS – Quadrados médios

F<sub>0</sub> – Distribuição de Fisher

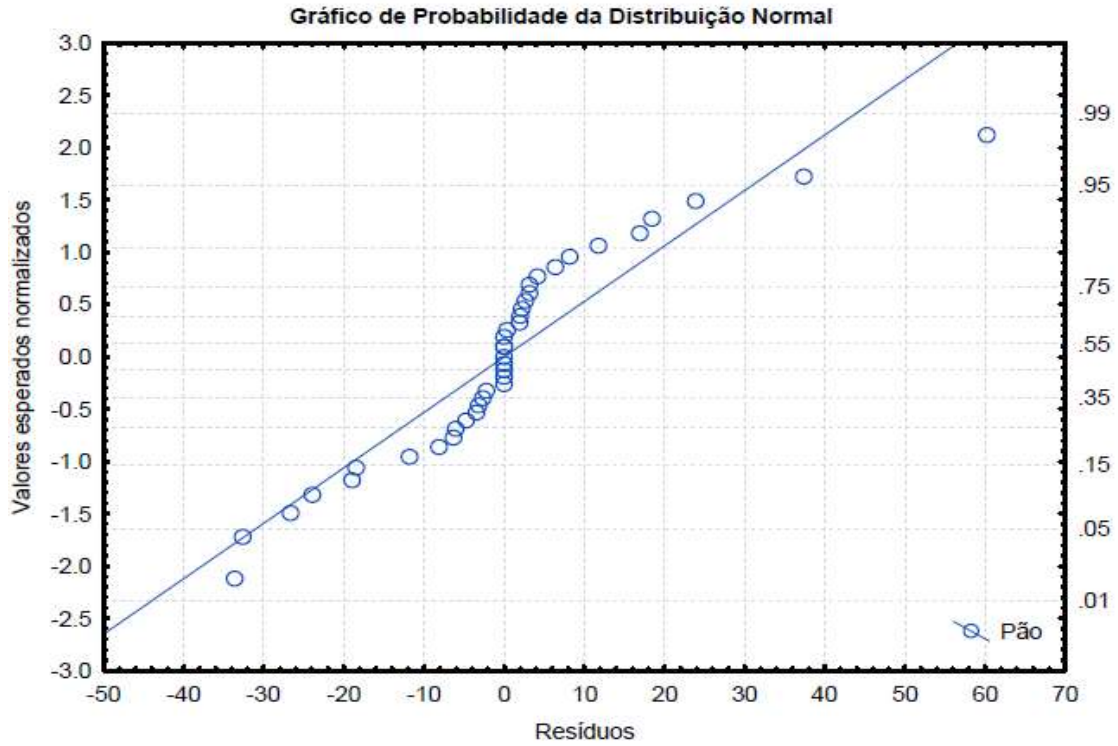
Sig. (p) - p-value, nível de significância

Pela análise da ANOVA, Tabela B.3, pode concluir-se que existem diferenças significativas para  $p < 0,05$  entre as diversos grupos de amostras. Como tal, recorreu-se ao teste da menor diferença significativa (LSD) de modo a se determinar quais as variedades que apresentavam diferenças significativas entre si Tabela B.4.

**Tabela B. 4** Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD

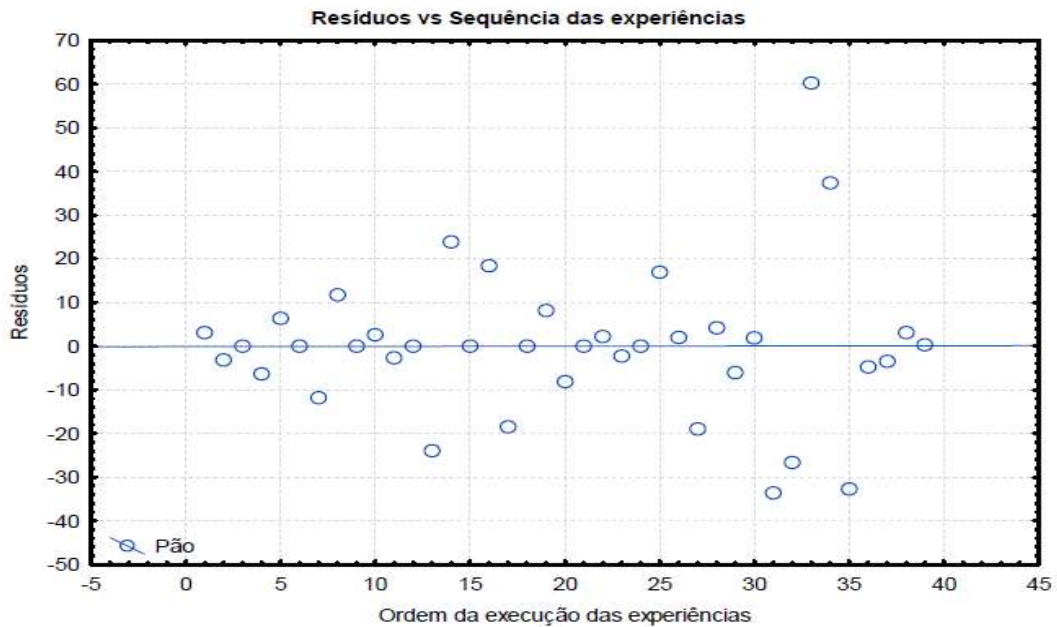
Amostras	Amostra (A)	Amostra (B)	Diferença entre médias ( $ \bar{A} - \bar{B} $ )	Sig. (p)
Pão	Broa	Baguete	190,89*	0,000
		Baguete Integral	16,088	0,348
		Pão Cereais	29,849	0,088
		Pão	213,18*	0,000
		Pão Centeio	297,04*	0,000
		Bola	18,481	0,282
		Pão tremoço	458,078*	0,000
		Pão azeitonas e nozes	81,286*	0,000
		Pão canela	830,88*	0,000
		Pão Azeitonas	907,03*	0,000
		Pão coco	412,39*	0,000
		Pão beterraba	821,04*	0,000

\*As diferenças entre as médias são significativamente diferentes para  $p < 0,05$



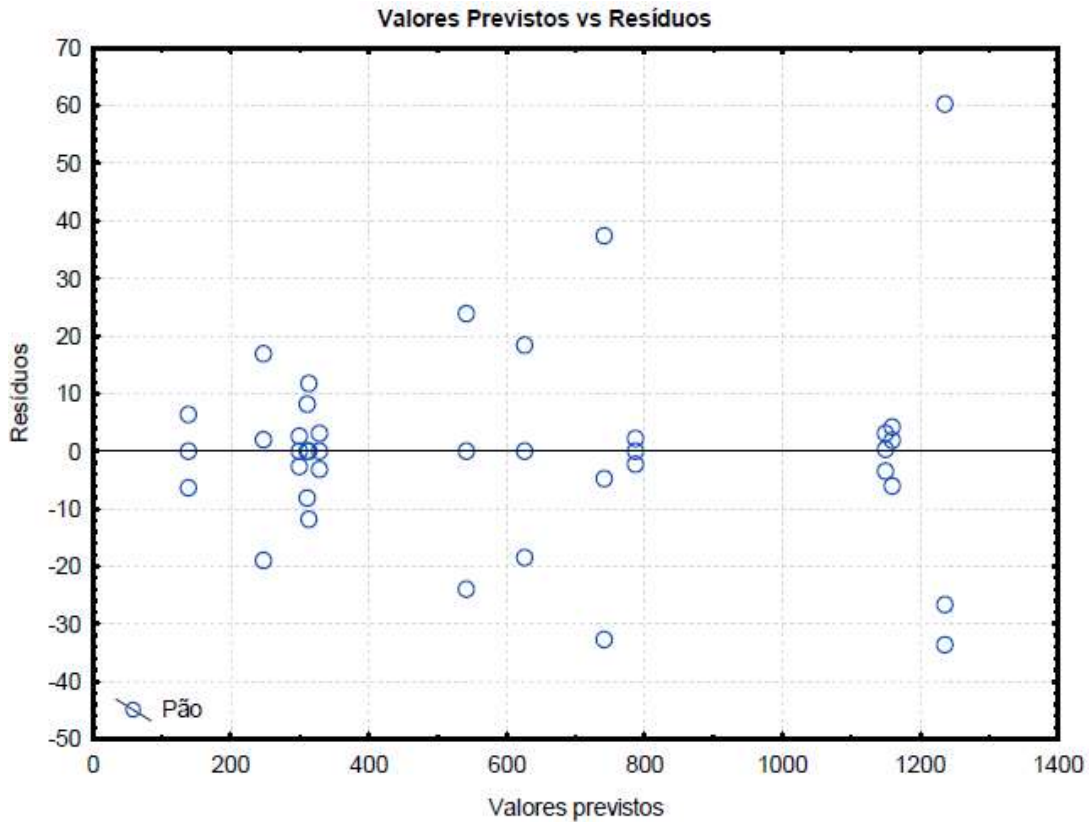
**Figura B. 7** Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras de pães.

O gráfico anterior (Figura B.7) indica que o pressuposto da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras pães é satisfeito, uma vez que os resíduos se dispõem à volta da reta, não indicando uma violação dos pressupostos.



**Figura B. 8** Verificação da independência para a determinação de acrilamida para as amostras de pães.

O gráfico dos resíduos em função da ordem aleatória de execução das experiências (Figura B.8) parece não mostrar violação de pressupostos na determinação de acrilamida, uma vez que não se verifica tendências especiais na disposição dos resíduos.



**Figura B. 9** Verificação da homogeneidade da variância na determinação de acrilamida nas amostras de pães.

O gráfico anterior (Figura B.9) parece indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância, uma vez que apresentam uma estrutura especial, no entanto, mais uma vez é relevante o facto de a dimensão da amostra ser muito pequena o que conduz a um resultado inconclusivo. Como tal, recorreu-se ao teste de Levene, onde se obteve resultado concordante com o parecer anterior, sendo assim verifica-se uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância para as amostras de pães.

**Produto de pastelaria****Tabela B. 5** ANOVA para a determinação de AA realizadas às amostras do produto de pastelaria

Fonte de variação		SS	g.l.	MS	F <sub>0</sub>	Sig. (p)
<b>Produto de pastelaria</b>	Entre variedades	86880	4	21720	14,391	0,000
	Erro (interior)	15093	10	1509		
	Total	101973	14			

Onde,

SS – Soma dos quadrados

g.l – Graus de liberdade

MS – Quadrados médios

F<sub>0</sub> – Distribuição de Fisher

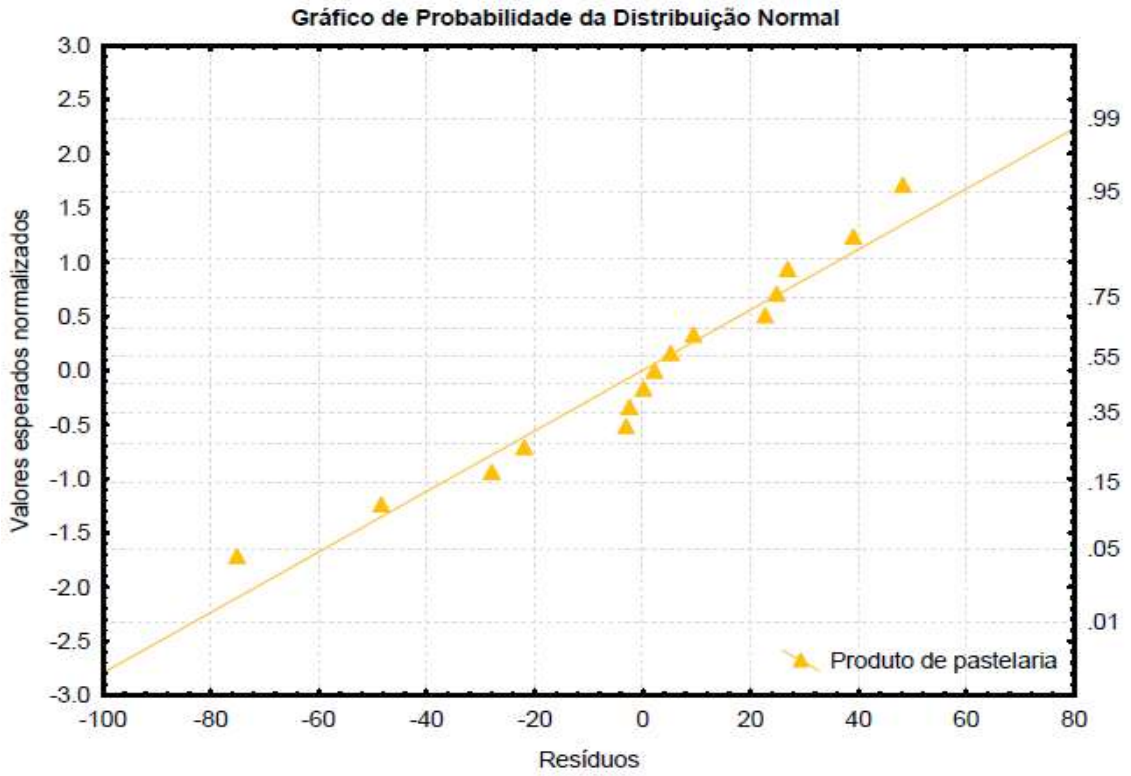
Sig. (p) - p-value, nível de significância

Pela análise da ANOVA, Tabela B. 5, pode concluir-se que existem diferenças significativas para  $p < 0,05$  entre as diversos grupos de amostras. Como tal, recorreu-se ao teste da menor diferença significativa (LSD) de modo a se determinar quais as variedades que apresentavam diferenças significativas entre si, Tabela B.6.

**Tabela B. 6** Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD

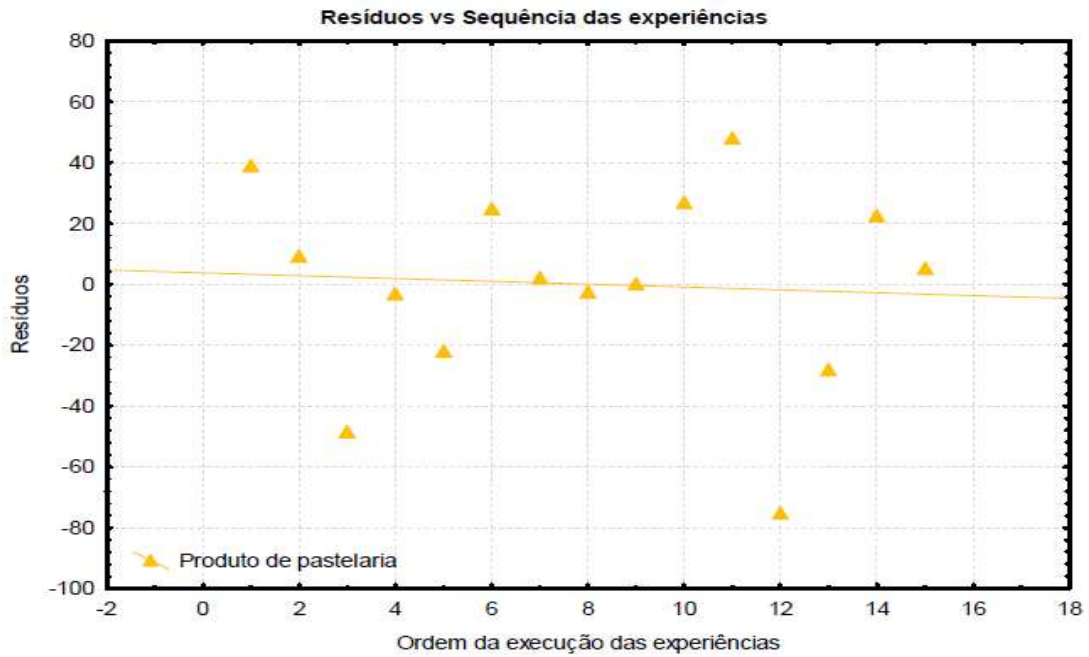
Amostras	Amostra (A)	Amostra (B)	Diferença entre médias ( $ \bar{A} - \bar{B} $ )	Sig. (p)
Produto de Pastelaria	Controlo	Amostra A	102,27*	0,001
		Amostra B	30,10	0,365
		Amostra C	176,89*	0,000
		Amostra D	109,86*	0,001
	Amostra A	Amostra B	132,36*	0,002
		Amostra C	74,63*	0,040
		Amostra D	7,60	0,816
	Amostra B	Amostra C	206,99*	0,000
		Amostra D	139,96*	0,001
	Amostra C	Amostra D	67,03	0,061

\*As diferenças entre as médias são significativamente diferentes para  $p < 0,05$



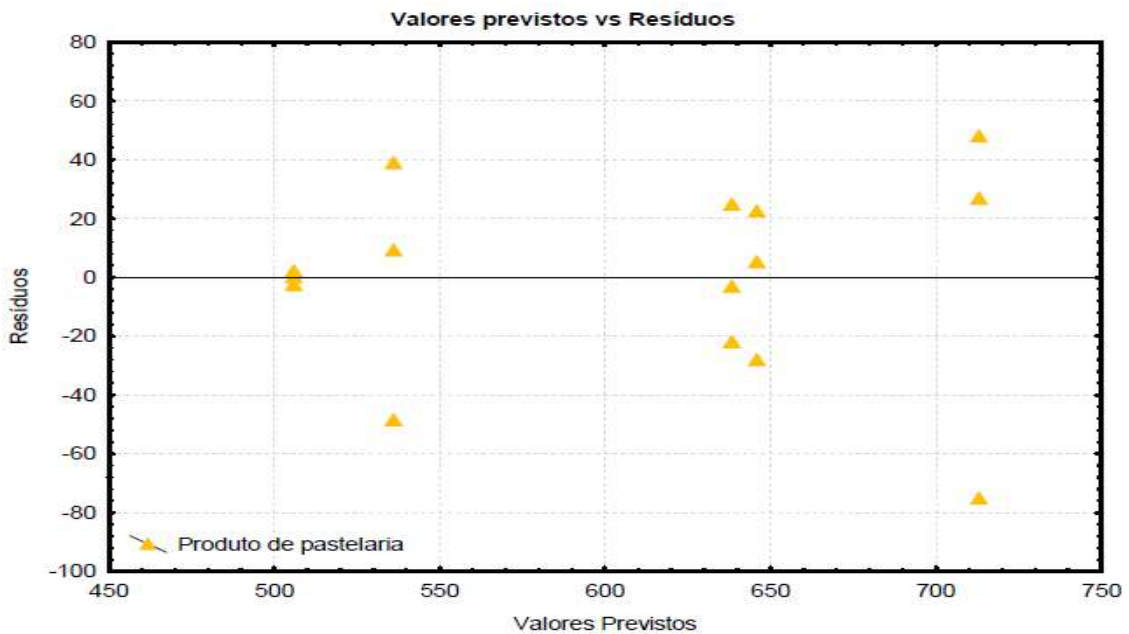
**Figura B. 10** Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras do produto de pasteleria.

O gráfico anterior (Figura B.10) indica que o pressuposto da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras do produto de pasteleria é satisfeito, uma vez que os resíduos se dispõem à volta da reta, não indicando uma violação dos pressupostos.



**Figura B. 11** Verificação da independência para a determinação de acrilamida para as amostras do produto de pasteleria.

O gráfico dos resíduos em função da ordem aleatória de execução das experiências (Figura B.11) parece não mostrar violação de pressupostos na determinação de acrilamida, uma vez que não se verifica tendências especiais na disposição dos resíduos.



**Figura B. 12** Verificação da homogeneidade da variância na determinação de acrilamida nas amostras do produto de pasteleria.

O gráfico anterior (Figura B.12) parece indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância, uma vez que apresentam uma estrutura especial, no entanto, mais uma vez é relevante o facto de a dimensão da amostra ser muito pequena o que conduz a um resultado inconclusivo. Como tal, recorreu-se ao teste de Levene, onde se obteve resultado concordante com o parecer anterior, sendo assim verificase uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância para as amostras do produto de pastelaria.



## Anexo C – Análise de variância das Estratégias de redução

### Produtos com base A e B

**Tabela C. 1** ANOVA para a determinação de AA realizadas às amostras de produto A e B

Fonte de variação		SS	g.l.	MS	F0	Sig. (p)
Produto com base A	Entre variedades	6478628	18	359924	667,54	0,000
	Erro (interior)	20489	38	539		
	Total	6499117	56			
Produto com base B	Entre variedades	1657296	18	92072	254,16	0,000
	Erro (interior)	13766	38	362		
	Total	1671062	56			
Fermentação base A	Entre variedades	711993	3	237331	318,505	0,000
	Erro (interior)	5961	8	745		
	Total	717954	11			

Onde,

SS – Soma dos quadrados

g.l – Graus de liberdade

MS – Quadrados médios

F<sub>0</sub> – Distribuição de Fisher

Sig. (p) – p-value/Nível mínimo de significância

Pela análise da ANOVA (Tabela C.1) pode-se concluir que existem diferenças significativas para  $p < 0,05$  entre as diferentes variedades de grão de arroz, para qualquer uma das análises determinadas (humidade, cinza, proteína e gordura). Como tal, recorreu-se ao teste da menor diferença significativa (LSD) de modo a se determinar quais as variedades que apresentavam diferenças significativas entre si, Tabela C.2. Nesta tabela está exemplificado um exemplo de como se procedeu ao teste de LSD para as restantes amostras.

**Tabela C. 2** Identificação das diferenças significativas pelo teste LSD

Amostras	Amostra (A)	Amostra (B)	Diferença entre médias ( $ \bar{A} - \bar{B} $ )	Sig. (p)
Produto com base A	Controlo	Mistura 1	913,02*	0,000
		Mistura 2	565,09*	0,000
		Mistura 3	209,46*	0,000
		Mistura 4	538,47*	0,000
		Mistura 5	446,26*	0,000
		Mistura 6	75,21*	0,000
		Mistura 7	667,91*	0,000
		Mistura 8	835,98*	0,000
		Mistura 9	276,78*	0,000
		Mistura 10	310,56*	0,000
		Mistura 11	1003,69*	0,000
		Mistura 12	513,98*	0,000
		Mistura 13	938,88*	0,000
		Mistura 14	581,70*	0,000
		Mistura 15	899,55*	0,000
		Mistura 16	573,97*	0,000
		Mistura 17	454,15*	0,000
		Mistura 18	989,59*	0,000

\*As diferenças entre as médias são significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

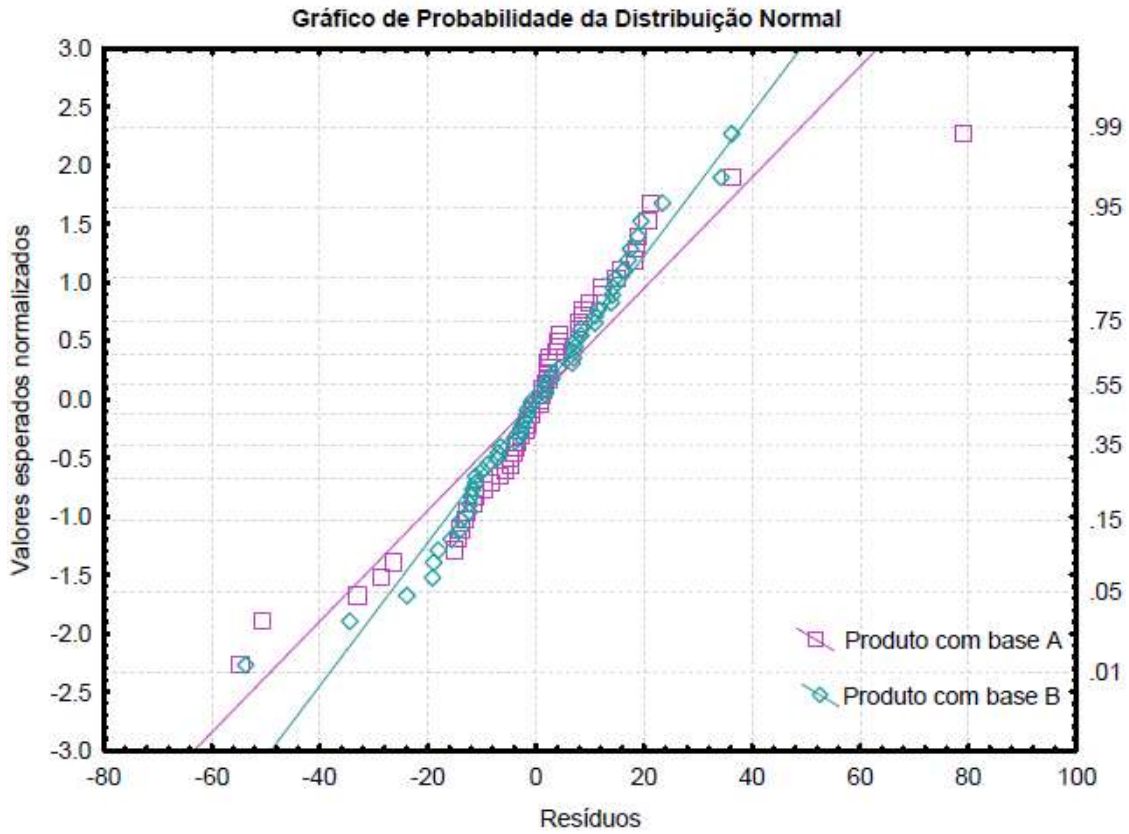


Figura C. 1 Verificação da normalidade para a determinação de AA nas amostras de produto com base A e B.

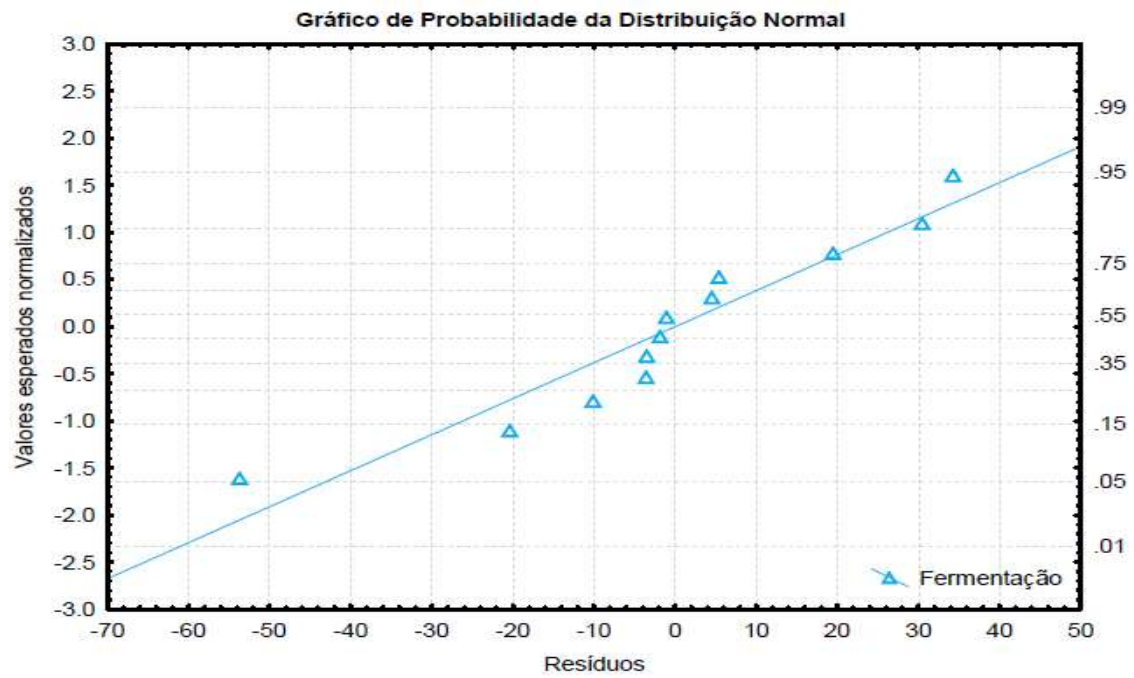
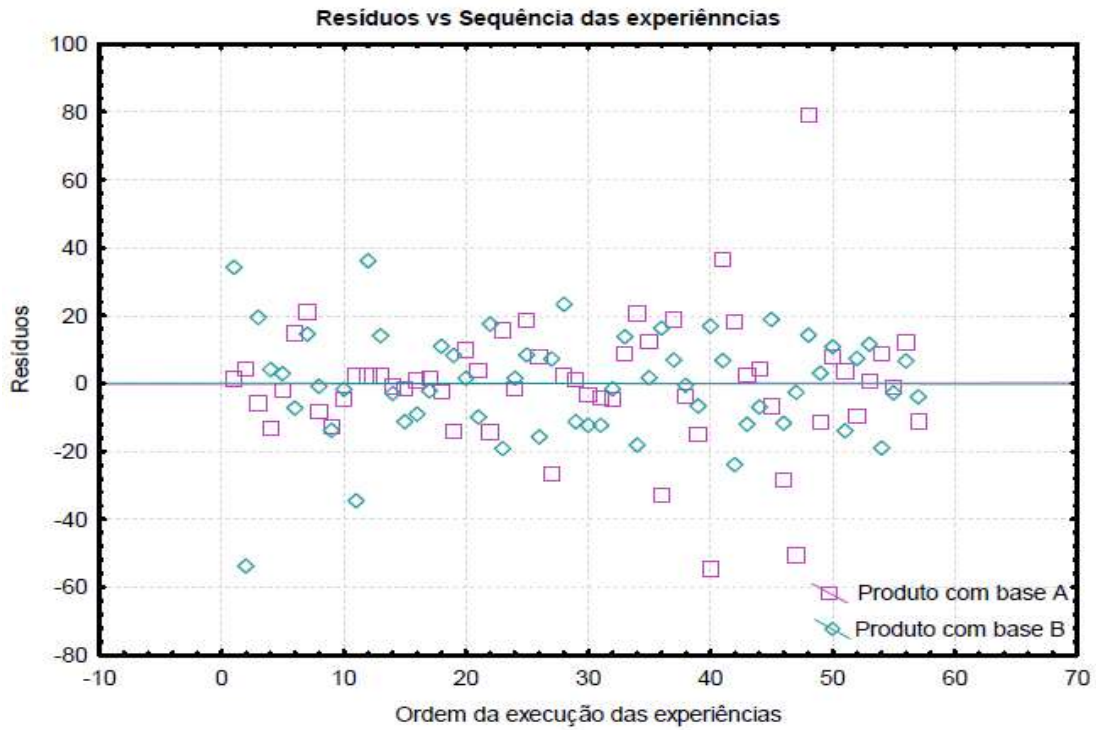
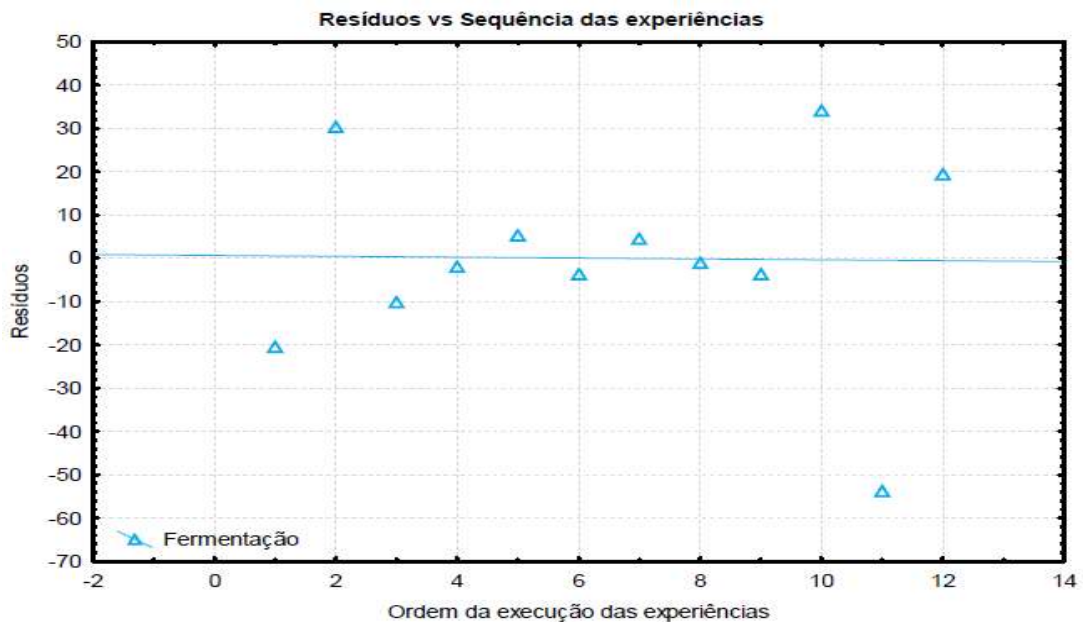


Figura C. 2 Verificação da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras de fermentação.

Os gráficos anteriores (Figura C.1 e Figura C.2) indicam que o pressuposto da normalidade para a determinação de acrilamida nas amostras produtos com base A e B e de fermentação é satisfeito, uma vez que os resíduos se dispõem à volta da reta, não indicando uma violação dos pressupostos.

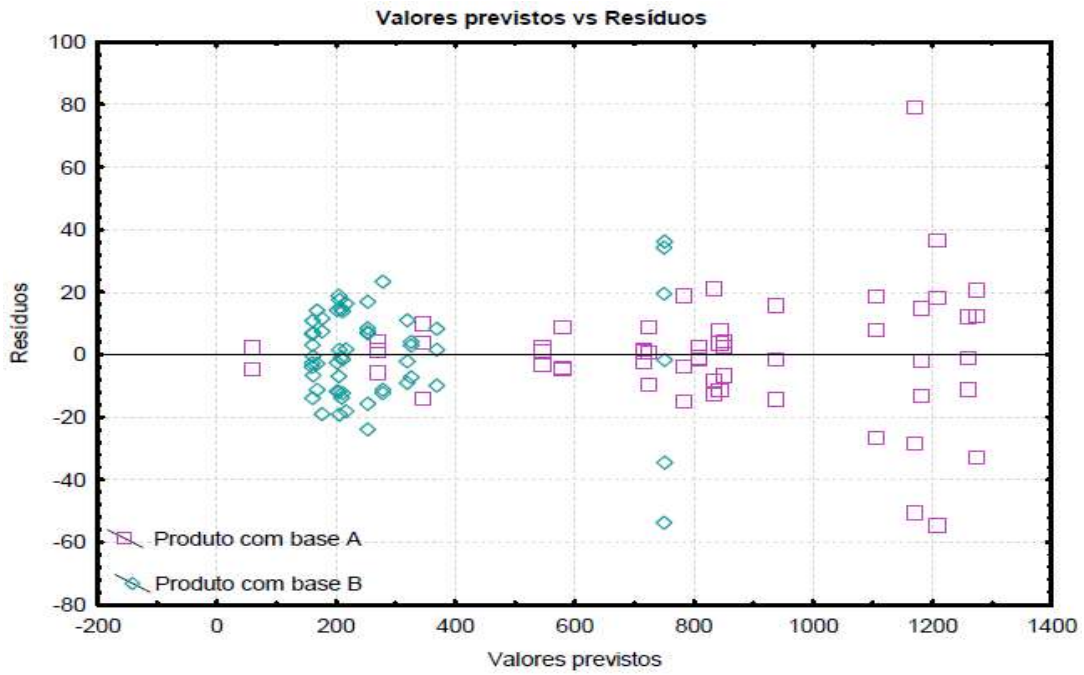


**Figura C. 3** Verificação da independência para a determinação de AA para as amostras de produto A e B.

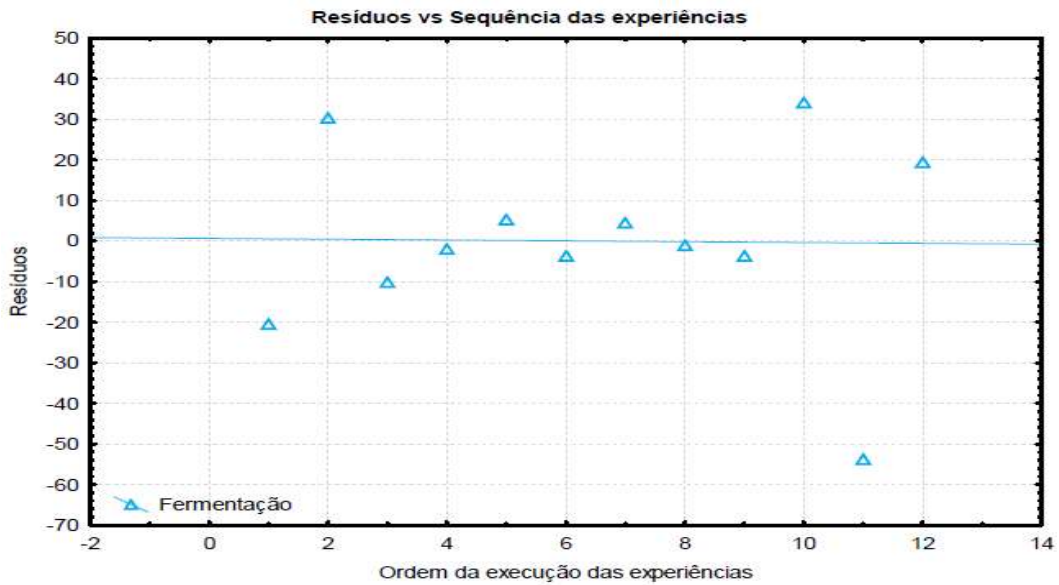


**Figura C. 4** Verificação da independência para a determinação de AA para as amostras de Fermentação.

Os gráficos dos resíduos em função da ordem aleatória de execução das experiências (Figura C.3 e Figura C.4) parecem não mostrar violação de pressupostos na determinação de acrilamida, uma vez que não se verifica tendências especiais na disposição dos resíduos



**Figura C. 5** Verificação da homogeneidade da variância na determinação de AA nas amostras de produto com base A e B.



**Figura C. 6** Verificação da homogeneidade na determinação de AA nas amostras de fermentação.

Os gráficos anteriores (Figura C.5 e Figura C.6) parecem indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância, uma vez que apresentam uma estrutura especial, no entanto, mais uma vez é relevante o facto de a dimensão da amostra ser muito pequena o que conduz a um resultado inconclusivo. Como tal, recorreu-se ao teste de Levene, onde se obteve resultado concordante com o parecer anterior, sendo assim verifica-se uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância para os produtos com base A e com base B e as amostras de fermentação com base A.