



Mariana Correia Costa

Licenciada em Engenharia Química e Bioquímica

Determinação dos Teores de Acrilamida em alimentos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

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

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa
Novembro, 2021

Determinação dos Teores de Acrilamida em alimentos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

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

MARIANA CORREIA COSTA

Licenciada em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Mestre Vera Canelas, Responsável Técnica do Laboratório da Química, SGS

Coorientadores: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio, Professor Associado, NOVA University Lisbon

Júri:

Presidente: Professora Doutora Maria Madalena Alves Campos de Sousa Dionísio Andrade, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

Arguentes: Professora Doutora Ana Luísa Alença da Cruz Fernando, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

Vogais: Mestre Vera Cristina Calção Canelas, SGS Portugal - Sociedade Geral de Superintendência S.A.

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa
Novembro, 2021

Determinação dos Teores de Acrilamida em alimentos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

Copyright © (NOME DO AUTOR), 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.

Dedicatória lorem ipsum

AGRADECIMENTOS

A elaboração da presente dissertação marca o final de um percurso muito importante na minha vida e que só foi possível ser construído graças a certas pessoas que me acompanharam ao longo desta jornada. A todas elas presto a minha mais sincera gratidão por terem marcado a minha vida e estarem sempre do meu lado nos momentos mais difíceis e nas minhas vitórias.

Em especial, ao professor Mário Fernando José Eusébio por me ter acompanhado neste desafio e ter aceitado ser o meu orientador, pois sem ele este projeto não teria sido possível. Agradeço toda a sua compreensão, transmissão de conhecimentos, disponibilidade, por me fazer ter sempre pensamento crítico e fazer sempre ver além do óbvio, foi sem dúvida um grande apoio durante todo este percurso.

À SGS apenas tenho que agradecer o modo como me acolheram de braços abertos e me terem oferecido a oportunidade de ingressar numa empresa de prestígio mundial, com uma equipa excepcional.

À mestre Vera Canelas, responsável pelo laboratório químico da SGS, guardo um carinho especial pelo modo como me recebeu e integrou no laboratório, por todo o apoio e orientação disponibilizado ao longo do estágio curricular e por toda ajuda imprescindível, sem ela este caminho teria sido muito mais duro.

Às minhas queridas colegas de laboratório, Ana Marques, Mariana Ribeiro e Marta Loureiro, pela amabilidade e simpatia ao longo destes meses, que estiveram para mim nos momentos mais difíceis e que tive o prazer de partilhar e receber conhecimentos.

Aos meus colegas de curso que me acompanharam ao longo destes últimos cinco anos, e que tive a sorte de conhecer e partilhar momentos únicos que me marcarão para o resto da vida.

Por fim, mas não menos importante, aos que sem eles eu não teria tido forças para aguentar até ao fim, aos meus pais por sempre terem acreditado em mim e me terem apoiado incondicionalmente, à minha querida irmã que sei que com ela posso sempre contar até ao fim, aos melhores avós do mundo que estiveram sempre presentes em todos os momentos e ao meu namorado por toda a paciência e apoio que me deu sem nunca me deixar ir abaixo. Um gigante obrigado por sempre terem acreditado em mim.

A todos vocês que estiveram sempre lá para mim nesta difícil caminhada, eu quero agradecer do fundo do coração. Muito Obrigada.

*“Faz o que ninguém faz, para chegares onde ninguém chega”
(Anónimo)*

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo principal validar o método analítico de quantificação dos níveis de acrilamida em alimentos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (UPLC-MS/MS), com ionização por *electrospray*.

Foram analisadas as matrizes alimentares mais comumente analisadas no laboratório da SGS e que possuíam um maior teor de acrilamida através de diversos métodos de extração, até concluir o que melhor se adequava às condições laboratoriais de modo a alcançar os resultados pretendidos para a validação do mesmo. As três matrizes alimentares validadas são pão, batatas fritas e bolachas/cereais, e o analito de interesse é extraído a partir dos alimentos pão e bolachas/cereais através de uma solução aquosa de ácido acético e das soluções Carrez I e II e por extração em fase sólida no caso da matriz da batata frita e bolachas/cereais, devido à sua complexidade matricial.

Está comprovado que o consumo de acrilamida potencia o risco de desenvolvimento de cancro. É considerada um contaminante pela Comissão da União Europeia implementou medidas de mitigação e níveis de referência, o que leva a um controlo de qualidade rigoroso em certos grupos alimentares específicos de modo a proteger a saúde dos consumidores e regular os seus níveis nos respetivos alimentos.

Para a validação do método analítico por cada tipo de matriz foram avaliados os parâmetros da especificidade e seletividade, das curvas de calibração bem como o estudo sobre a sua linearidade, da precisão com um estudo da reprodutibilidade e precisão intermédia, dos limites analíticos, da robustez e da exatidão.

Verifica-se após a avaliação dos parâmetros para a validação do método analítico de cada uma das matrizes, que estes são aceites pelos critérios estabelecidos e, por tanto, o objetivo proposto foi atingido e os métodos analíticos podem ser aplicados na rotina diária do laboratório da SGS.

Palavras-Chave: Acrilamida, UPLC-MS/MS, Implementação, Validação, Matrizes Alimentares, Extração por Solventes, Extração em Fase Sólida.

ABSTRACT

The main objective of this work is to validate the analytical method for quantifying acrylamide levels in foods by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), with electrospray ionization.

The food matrixes most commonly analyzed in the SGS laboratory and that had the highest acrylamide content were analyzed using several extraction methods, until the one that best suited the laboratory conditions was concluded in order to achieve the desired results for its validation. The three food matrices validated are bread, potato French fries and crackers/cereals, and the analyte of interest is extracted from the bread and crackers/cereals foods through an aqueous solution of acetic acid and Carrez I and II solutions and by solid phase extraction in the case of the potato chips and crackers/cereals matrix due to its matrix complexity.

It has been proven that the consumption of acrylamide increases the risk of developing cancer. It is considered a contaminant by the European Commission and has implemented mitigation measures and reference levels, which leads to strict quality control in certain specific food groups in order to protect consumers health and regulate its levels in their food.

For the validation of the analytical method for each type of matrix, the parameters of specificity and selectivity, the calibration curves were evaluated as well as the study on their linearity, precision with a study on reproducibility and intermediate precision, analytical limits, robustness and accuracy.

After the evaluation of the parameters for the validation of the analytical method for each of the matrixes, it is verified that they are accepted by the established criteria and, therefore, the proposed objective was achieved, and the analytical methods can be applied in the daily routine of the SGS laboratory.

Keywords: Acrylamide, UPLC-MS/MS, Implementation, Validation, Food Matrices, Solvent Extraction, Solid Phase Extraction.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Enquadramento	1
1.2.	Objetivos	2
1.3.	Empresa SGS	2
1.4.	Estrutura da Dissertação	3
2.	ESTADO DA ARTE	5
2.1.	Acrilamida	5
2.1.1.	Formação da Acrilamida nos alimentos.....	5
2.1.2.	Principais fatores que influenciam a formação da acrilamida	7
2.1.3.	Alimentos ricos em Acrilamida e nível de referência.....	7
2.1.4.	Toxicidade da acrilamida	8
2.2.	Método analítico para a quantificação da acrilamida	9
2.2.1.	Preparação da Amostra	10
2.2.2.	Análise da Acrilamida.....	12
2.2.3.	Teoria da Cromatografia	13
2.2.4.	Cromatografia Líquida (LC)	13
2.2.5.	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC).....	14
2.2.6.	Espectrometria de Massa (MS)	16
2.2.7.	Extração em Fase Sólida (SPE)	18
2.3.	Validação do método analítico da quantificação de acrilamida	20
2.3.3.	Planeamento da Validação do Método Analítico	20
2.3.4.	Especificidade / Seletividade	21
2.3.5.	Curvas de Calibração.....	22
2.3.6.	Precisão.....	23
2.3.7.	Reprodutibilidade	23
2.3.8.	Repetibilidade	23
2.3.9.	Precisão Intermédia	24
2.3.10.	Limites Analíticos	24
2.3.11.	Robustez.....	25
2.3.12.	Exatidão	26
2.3.13.	Efeito Matriz.....	26

2.4. Procedimento Experimental.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1. Materiais	36
3.1.1. Preparação da amostra	36
3.1.2. Análise da amostra.....	38
3.1.3. Reagentes.....	39
3.2. Métodos	40
3.2.1. Preparação da fase móvel.....	40
3.2.2. Preparação das soluções de extração	41
3.2.3. Preparação das soluções padrão.....	42
3.2.4. Curvas de Calibração em extrato	43
3.2.5. Curva de Calibração em solvente	44
3.2.6. Preparação das amostras fortificadas	44
4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS	46
4.1. Validação da matriz bolachas/cereais	46
4.1.1. Especificidade / Seletividade.....	46
4.1.2. Gama de trabalho e Linearidade	48
4.1.3. Repetibilidade	52
4.1.4. Precisão Intermédia	54
4.1.5. Limites Analíticos	56
4.1.6. Efeito Matriz.....	57
4.1.7. Cromatograma	58
4.2. Validação da matriz batatas fritas.....	60
4.2.1. Especificidade / Seletividade.....	60
4.2.2. Gama de trabalho e Linearidade	61
4.2.3. Repetibilidade	63
4.2.4. Precisão Intermédia	65
4.2.5. Limites Analíticos	66
4.2.6. Efeito Matriz.....	66
4.2.7. Cromatograma	67
4.3. Validação da matriz pão	68
4.3.1. Especificidade / Seletividade.....	68
4.3.2. Gama de trabalho e Linearidade	69
4.3.3. Repetibilidade	72
4.3.4. Precisão Intermédia	73
4.3.5. Limites Analíticos	74
4.3.6. Efeito Matriz.....	74
4.3.7. Cromatograma	75
Conclusões	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO A - LIMITES ANALÍTICOS E TAXAS DE RECUPERAÇÃO DE ACORDO COM A LITERATURA	85

ANEXO B - ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA DE SERVIÇO DA DETERMINAÇÃO DE
ACRILAMIDA. 87

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - ESTRUTURA MOLECULAR DA ACRILAMIDA	5
FIGURA 2.2 - MECANISMO DE FORMAÇÃO PELA REAÇÃO DE MAILLARD	6
FIGURA 2.3 - MECANISMO DE FORMAÇÃO POR VIA DOS LÍPIDOS E DA CARNOSINA	6
FIGURA 2.4 - CLASSIFICAÇÃO DA CROMATOGRAFIA ADAPTADO DE	12
FIGURA 2.5 - SISTEMA UPLC	14
FIGURA 2.6 - ESQUEMA DE UM SISTEMA DE ESPECTROMETRIA DE MASSA EM <i>TANDEM</i>	16
FIGURA 2.7 - ESQUEMA DE UM ESPECTRÓMETRO DE MASSA DE TRIPLO QUADRUPLO USADO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	17
FIGURA 2.8 - ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA AMOSTRAS QUE CONTENHAM ACRILAMIDA.....	19
FIGURA 2.9 - FLUXOGRAMA ALUSIVO AO PROCEDIMENTO DA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO. .	22
FIGURA 2.10 - LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO PARA CADA ARTIGO CIENTÍFICO.	30
FIGURA 2.11 - LIMITES ANALÍTICOS E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA CADA ARTIGO CIENTÍFICO ESTUDADO.	30
FIGURA 2.12 - TAXA DE RECUPERAÇÃO PARA CADA ARTIGO CIENTÍFICO.	31
FIGURA 2.13 - TAXA DE RECUPERAÇÃO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA CADA ARTIGO CIENTÍFICOS ESTUDADO.	31
FIGURA 2.14 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL EM VIGOR NO LABORATÓRIO ANTES DO ESTUDO.	32-33
FIGURA 2.15 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL COM EXTRAÇÃO POR SPE.	33-34
FIGURA 3.1 - MOINHO TRITURADOR GM 300.	36
FIGURA 3.2 - BALANÇA ANALÍTICA.	36
FIGURA 3.3 - MOINHO TRITURADOR GM 200.	36
FIGURA 3.4 - MICROPIPETAS 10 µL.	37
FIGURA 3.5 - MICROPIPETA 100 µL.....	37
FIGURA 3.6 - MICROPIPETA 1000 µL.....	37
FIGURA 3.7 - SERINGAS DESCARTÁVEIS.	37
FIGURA 3.8 - FILTROS 0,45 µM.	37
FIGURA 3.9 - <i>MANIFOLD</i> E BOMBA SPE.....	37
FIGURA 3.10 - CARTUCHOS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	37
FIGURA 3.11 - CENTRÍFUGA DE MESA.	38
FIGURA 3.12 - AGITADOR <i>MULTIREAX</i>	38
FIGURA 3.13 - MATERIAL DE VIDRO DE LABORATÓRIO.	38
FIGURA 3.14 - COLUNA CROMATOGRÁFICA <i>HYPERCARB</i>	39
FIGURA 3.15 - UHPLC-MS/MS.....	39
FIGURA 3.16 - TAMPAS DOS <i>VIALS</i>	39
FIGURA 3.17 - <i>VIALS</i>	39
FIGURA 3.18 - ÁGUA MILLI-Q.....	40
FIGURA 3.19 - ÁCIDO FÓRMICO PARA LC-MS	40
FIGURA 3.20 - ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL	40
FIGURA 3.21 - METANOL PARA LC-MS.....	40
FIGURA 3.22 - ÁGUA ULTRAPURA PARA HPLC	40
FIGURA 3.23 - PADRÃO ACRILAMIDA	40
FIGURA 3.24 - FASE MÓVEL A E FASE MÓVEL B	41

FIGURA 3.25 - SOLUÇÃO AQUOSA DE ÁCIDO ACÉTICO (0,2MM)	41
FIGURA 3.26 - SOLUÇÕES CARREZ I (AMARELA) E CARREZ II (INCOLOR).....	41
FIGURA 3.27 - SOLUÇÃO AQUOSA DE ÁCIDO FÓRMICO (0,1%)	42
FIGURA 3.28 - SOLUÇÃO MÃE DE ACRILAMIDA (1000 PPM)	42
FIGURA 3.29 - SOLUÇÕES DE TRABALHO (10, 1 E 0,1 PPM)	43
FIGURA 4.1- CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS COM A RESPETIVA LINHA DE TENDÊNCIA, POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	48
FIGURA 4.2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS COM A RESPETIVA LINHA DE TENDÊNCIA, POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL DE SOLVENTES.....	49
FIGURA 4.3 - GRÁFICO DA ANÁLISE DE RESÍDUOS REFERENTE À MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS, POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	51
FIGURA 4.4 - GRÁFICO DA ANÁLISE DE RESÍDUOS REFERENTE À MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS, POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL DE SOLVENTES.	51
FIGURA 4.5 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA REPRESENTATIVA DA MATRIZ BOLACHAS/ CEREAIS PARA A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM AS SOLUÇÕES CARREZ.	58
FIGURA 4.6 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA FORTIFICADA REPRESENTATIVA DA MATRIZ BOLACHAS/ CEREAIS PARA A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM AS SOLUÇÕES CARREZ.	58
FIGURA 4.7 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA REPRESENTATIVA DA MATRIZ BOLACHAS/ CEREAIS PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	59
FIGURA 4.8 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA FORTIFICADA REPRESENTATIVA DA MATRIZ BOLACHAS/ CEREAIS PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	59
FIGURA 4.9 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A MATRIZ BATATAS FRITAS COM A RESPETIVA LINHA DE TENDÊNCIA, POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	61
FIGURA 4.10 - GRÁFICO DA ANÁLISE DE RESÍDUOS REFERENTE À MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS, POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	63
FIGURA 4.11 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA REPRESENTATIVA DA MATRIZ BATATAS FRITAS PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	67
FIGURA 4.12 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA FORTIFICADA REPRESENTATIVA DA MATRIZ BATATAS FRITAS PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	67
FIGURA 4.13 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A MATRIZ PÃO COM A RESPETIVA LINHA DE TENDÊNCIA, POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES.	70
FIGURA 4.14 - GRÁFICO DA ANÁLISE DE RESÍDUOS REFERENTE À MATRIZ PÃO, POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES.....	71
FIGURA 4.15 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA REPRESENTATIVA DA MATRIZ PÃO PARA A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM AS SOLUÇÕES CARREZ.	75
FIGURA 4.16 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA FORTIFICADA REPRESENTATIVA DA MATRIZ PÃO PARA A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM AS SOLUÇÕES CARREZ.	76

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2.1 - NÍVEIS DE REFERÊNCIA PARA A PRESENÇA DE ACRILAMIDA NOS GÊNEROS ALIMENTÍCIOS REFERIDOS	7
TABELA 2.2 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICOS DO MÉTODO ANALÍTICO.	18
TABELA 2.3 - CLASSIFICAÇÃO DOS ENSAIOS EM FUNÇÃO DA SUA FINALIDADE.....	20
TABELA 2.4 - PARÂMETROS A SEREM ESTUDADOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO EM FUNÇÃO DA SUA CATEGORIA ATRIBUÍDA.	21
TABELA 2.5 - ENUMERAÇÃO DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS ESTUDADOS, EVIDENCIANDO OS RESPECTIVOS AUTORES E O A ANO PUBLICADO.	27
TABELA 2.6 - MATRIZES ANALISADAS NOS RESPECTIVOS ARTIGOS CIENTÍFICOS ESTUDADOS	28
TABELA 2.7 - MATRIZES ANALISADAS NOS RESPECTIVOS ARTIGOS CIENTÍFICOS ESTUDADOS.	29
TABELA 2.8 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA CADA ARTIGO CIENTÍFICO ESTUDADO.....	29
TABELA 3.1 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO EM EXTRATO.	43
TABELA 3.2 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO EM SOLVENTE AQUOSO DE ÁCIDO FÓRMICO (EXTRAÇÃO SPE) E DE ÁCIDO ACÉTICO (EXTRAÇÃO CONVENCIONAL).	44
TABELA 3.3 - NÍVEIS DAS FORTIFICADAS NAS MATRIZES ANALISADAS.	44
TABELA 4.1 - TAXAS DE RECUPERAÇÃO PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM MATRIZES CEREAIS/ BOLACHAS.	46
TABELA 4.2 - TAXAS DE RECUPERAÇÃO PARA EXTRAÇÃO COM SOLVENTES EM MATRIZES CEREAIS/ BOLACHAS.	47
TABELA 4.3 - MÉDIA, DESVIO PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO MÉDIA PARA AS TAXAS DE RECUPERAÇÃO DA MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS.	47
TABELA 4.4 - CONCENTRAÇÕES DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO COM AS RESPECTIVAS ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS PARA A MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS, POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	48
TABELA 4.5 - CONCENTRAÇÕES DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO COM AS RESPECTIVAS ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS PARA A MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS, POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL DE SOLVENTES.	49
TABELA 4.6 - LINEARIDADE RESPECTIVA À CURVA DE CALIBRAÇÃO COM A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES PARA A MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS.....	50
TABELA 4.7 - LINEARIDADE RESPECTIVA À CURVA DE CALIBRAÇÃO COM A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS.	50
TABELA 4.8 - DETERMINAÇÃO DA GAMA DE LINEARIDADE ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS RESÍDUOS PARA A MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS, POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	51
TABELA 4.9 - DETERMINAÇÃO DA GAMA DE LINEARIDADE ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS RESÍDUOS PARA A MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS, POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL DE SOLVENTES.	51
TABELA 4.10 - REPETIBILIDADE AO NÍVEL DO PC1 E DO PC2 DA CURVA DE CALIBRAÇÃO, COM O RESPECTIVO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA AS MATRIZES CEREAIS/ BOLACHAS, COM EXTRAÇÃO POR SOLVENTES.	52
TABELA 4.11 - HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DA GAMA DE TRABALHO, RELATIVAMENTE AOS RESULTADOS DE REPETIBILIDADE COM A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES EM MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS.	53
TABELA 4.12 - REPETIBILIDADE AO NÍVEL DO PC1 E DO PC2 DA CURVA DE CALIBRAÇÃO, COM O RESPECTIVO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA AS MATRIZES CEREAIS/ BOLACHAS, COM EXTRAÇÃO POR SOLVENTES.	53

TABELA 4.13 - HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DA GAMA DE TRABALHO, RELATIVAMENTE AOS RESULTADOS DE REPETIBILIDADE COM A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS.....	54
TABELA 4.14 - PRECISÃO INTERMÉDIA PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS.	55
TABELA 4.15 - PRECISÃO INTERMÉDIA PARA A EXTRAÇÃO POR SOLVENTES NA MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS, FORTIFICADA A 20 µG/KG.	55
TABELA 4.16 - PRECISÃO INTERMÉDIA PARA A EXTRAÇÃO POR SOLVENTES NA MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS, FORTIFICADA A 40 µG/KG.	55
TABELA 4.17 - LIMITES ANALÍTICOS PARA A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES EM MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS.	56
TABELA 4.18 - LIMITES ANALÍTICOS PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM MATRIZ CEREAIS/ BOLACHAS. ..	57
TABELA 4.19 - EFEITO MATRIZ PARA A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM AS SOLUÇÕES CARREZ NA MATRIZ BOLACHAS/ CEREAIS	57
TABELA 4.20 - EFEITO MATRIZ PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ BOLACHAS/ CEREAIS.....	57
TABELA 4.21 - TAXAS DE RECUPERAÇÃO PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ BATATAS FRITAS.....	60
TABELA 4.22 - MÉDIA, DESVIO PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO MÉDIA PARA AS TAXAS DE RECUPERAÇÃO DA MATRIZ BATATAS FRITAS.	61
TABELA 4.23 - CONCENTRAÇÕES DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO COM AS RESPECTIVAS ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS PARA A MATRIZ BATATAS FRITAS, POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	61
TABELA 4.24 - LINEARIDADE RESPECTIVA À CURVA DE CALIBRAÇÃO COM A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A MATRIZ BATATAS FRITAS.	62
TABELA 4.25 - DETERMINAÇÃO DA GAMA DE LINEARIDADE ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS RESÍDUOS PARA A MATRIZ BATATAS FRITAS, POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	63
TABELA 4.26 - REPETIBILIDADE AO NÍVEL DO PC1 E DO PC2 DA CURVA DE CALIBRAÇÃO, COM O RESPECTIVO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA A MATRIZ BATATAS FRITAS, COM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	64
TABELA 4.27 - HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DA GAMA DE TRABALHO, RELATIVAMENTE AOS RESULTADOS DE REPETIBILIDADE COM A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ BATATAS FRITAS.	64
TABELA 4.28 - PRECISÃO INTERMÉDIA PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ BATATAS FRITAS.....	65
TABELA 4.29 - PRECISÃO INTERMÉDIA PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ BATATAS FRITAS, FORTIFICADA A 40 µG/KG.	65
TABELA 4.30 - LIMITES ANALÍTICOS PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM MATRIZ BATATAS FRITAS.	66
TABELA 4.31 - EFEITO MATRIZ PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA MATRIZ BATATAS FRITAS.....	66
TABELA 4.32 - TAXAS DE RECUPERAÇÃO PARA EXTRAÇÃO COM SOLVENTES NA MATRIZ PÃO.	68
TABELA 4.33 - MÉDIA, DESVIO PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO MÉDIA PARA AS TAXAS DE RECUPERAÇÃO DA MATRIZ PÃO.	69
TABELA 4.34 - CONCENTRAÇÕES DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO COM AS RESPECTIVAS ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS PARA A MATRIZ PÃO, POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES.	69
TABELA 4.35 - LINEARIDADE RESPECTIVA À CURVA DE CALIBRAÇÃO COM A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES PARA A MATRIZ PÃO.	70
TABELA 4.36 - DETERMINAÇÃO DA GAMA DE LINEARIDADE ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS RESÍDUOS PARA A MATRIZ PÃO, POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES.	71
TABELA 4.37 - REPETIBILIDADE AO NÍVEL DO PC1 E DO PC2 DA CURVA DE CALIBRAÇÃO, COM O RESPECTIVO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA A MATRIZ PÃO, COM EXTRAÇÃO POR SOLVENTES.	72
TABELA 4.38 - HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DA GAMA DE TRABALHO, RELATIVAMENTE AOS RESULTADOS DE REPETIBILIDADE COM A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES NA MATRIZ PÃO.	73
TABELA 4.39 - PRECISÃO INTERMÉDIA PARA A EXTRAÇÃO POR SOLVENTES NA MATRIZ PÃO, FORTIFICADA A 20 µG/KG.	73
TABELA 4.40 - PRECISÃO INTERMÉDIA PARA A EXTRAÇÃO POR SOLVENTES NA MATRIZ PÃO, FORTIFICADA A 40 µG/KG.	74

TABELA 4.41 - LIMITES ANALÍTICOS PARA A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL POR SOLVENTES NA MATRIZ PÃO. .	74
TABELA 4.42 - EFEITO MATRIZ PARA A EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM AS SOLUÇÕES CARREZ NA MATRIZ PÃO	75

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 2.1 – TAXA DE RECUPERAÇÃO	22
EQUAÇÃO 2.2 - LIMITE DE REPETIBILIDADE.....	23
EQUAÇÃO 2.3 - COEFICIENTE MÉDIO DE VARIAÇÃO PARA A REPETIBILIDADE	24
EQUAÇÃO 2.4 - PRECISÃO INTERMÉDIA.....	24
EQUAÇÃO 2.5 - LIMITE DE DETEÇÃO	25
EQUAÇÃO 2.6 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	25
EQUAÇÃO 2.7 - EFEITO MATRIZ PERCENTUAL	53

1.1. Enquadramento

A preocupação sobre os efeitos da presença de acrilamida nos alimentos surgiu em 1997 devido às dificuldades na construção de um túnel ferroviário na Suécia. A controvérsia sobre o projeto começou com as grandes quantidades de água que vazavam nas rochas circundantes e que acabaram por se infiltrar na construção do túnel, sendo necessário selar o mesmo [1].

O isolante eleito, denominado de *Rhoca-Gil*, era constituído por dois fluídos, acrilamida e metiloacrilamida, e ao ser injetado nas rochas polimerizava em contacto com o ar tornando-se rígido, o que impedia a passagem da água. Foi utilizado 1400 quilogramas de isolante na construção do túnel, onde grande parte acabou por se dissolver na água infiltrada que, por sua vez, acabou por contaminar o rio adjacente. A elevada quantidade de isolante que foi utilizado aumentou significativamente os níveis de acrilamida no rio e provocou a morte de peixes, a paralisia a vacas e alguns problemas nas terminações nervosas das mãos e dos pés dos trabalhadores, tendo sido encontrado posteriormente fragmentos de acrilamida ligados à hemoglobina no sangue dos mesmos [2].

Com os resultados obtidos, os investigadores suecos responsáveis pelo caso iniciaram um estudo sobre as possíveis fontes de acrilamida, que à partida se basearam em processos a altas temperaturas, como a preparação de alguns alimentos. Em Abril de 2002, a Administração Nacional da Alimentação Sueca expos alguns dos resultados que obteve deste estudo numa conferência e, em 2003, a Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, a FDA, publicou os resultados da sua investigação sobre a acrilamida tendo confirmado a pesquisa sueca. Em Portugal, apenas no início de 2005 é que a DECO publicou resultados onde revelava as marcas de batatas fritas com maior teor de acrilamida.

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) confirmou, em 2015, que o consumo de acrilamida aumenta potencialmente o risco de desenvolvimento de cancro, o que levou a Comissão da União Europeia, em 2017, a estabelecer medidas de mitigação e níveis de referência para a redução da presença de acrilamida em géneros alimentícios através do Regulamento (UE) 2017/2158, que se vincula aos princípios do Regulamento (CE) n°852/2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios [3] [4].

Em suma, com a crescente preocupação da presença deste contaminante nos alimentos consumidos diariamente por toda a população, surgiu paralelamente a necessidade de criar métodos eficazes para quantificar a acrilamida nos grupos alimentares mais críticos.

1.2. Objetivos

Foi durante o último século que a preocupação sobre os riscos associados ao consumo de bens alimentares começou a propagar-se mundialmente, devido a certas crises que existiram nessa época, com particular incidência na Europa. Foi devido a estes acontecimentos e à evolução do processamento, consumo e transporte de bens alimentares aliado à mudança dos hábitos alimentares da população no geral que os consumidores começaram a perder a confiança no controlo da qualidade dos alimentos e na capacidade das autoridades públicas regularem e assegurarem a segurança da cadeia alimentar.

Atualmente, a acrilamida é considerada um contaminante e apesar de estar apenas definido níveis de referência, na União Europeia, para a sua concentração nos alimentos, é necessário um controlo da concentração da mesma, de modo a proteger a saúde dos consumidores e regular os seus níveis nos alimentos.

A quantificação da acrilamida é, geralmente, obtida com recurso a técnicas cromatográficas acoplada à espectrometria de massa. Tanto na cromatografia líquida como na cromatografia gasosa, o sucesso do método depende principalmente da etapa de extração e de purificação da preparação da amostra, visto que o principal problema nos métodos desenvolvidos é a eliminação dos interferentes da matriz.

Assim, o principal objetivo desta dissertação é a implementação e validação de um método analítico que quantifica os níveis de acrilamida nos alimentos que possuem um maior teor do contaminante, e que poderão afetar mais a saúde humana. As duas técnicas para a extração de acrilamida eleitas basearam-se num estudo e pesquisa para a preparação de amostras, baseadas em dois artigos científicos, decidiu-se aplicar métodos de extração diferentes às amostras devido à complexidade de algumas matrizes e da dificuldade da purificação do analito [5] [6]. Para ambas as extrações de acrilamida o método de análise a usar é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* com ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS/MS).

1.3. Empresa SGS

Société Générale de Surveillance (SGS S.A.), fundada a 12 de Dezembro de 1878, por Henri Goldstuck, em Rouen, na França, com o apoio de um amigo austríaco, iniciou a sua atividade na área da inspeção de grãos verificando a quantidade e a qualidade dos grãos que chegavam ao porto de Rouen, o que reduziu as perdas de mercadoria da entidade exportadora aumentando, consequentemente, os lucros da mesma. Devido à Primeira Guerra Mundial (1914-1918), em 1915, a sede da empresa foi transferida de Paris para Genebra, sendo a Suíça considerada um país neutro a SGS não sofreria tantas consequências com a crise associada à guerra. A 19 de julho 1919 a empresa adotou o nome que utiliza até hoje, *Société Générale de Surveillance* [7].

Rapidamente o negócio começou a ser reconhecido e valorizado pela qualidade e integridade, e atualmente a SGS é uma empresa líder na verificação, inspeção, testes e certificação que conta com mais de 94.000 funcionários em mais de 2.600 escritórios e laboratórios em todo o mundo [8]. Foi no início do ano 2000 que a SGS se segmentou em onze áreas de negócio (agricultura e alimentação, construção, energia, indústria química, bens de consumo e retalho, industrial, ciências biológicas, petróleo e gás, indústria mineira/mineração, setor público e transporte) em que atuava, e tendo esta reestruturação sido mantida até aos dias hoje [7].

A SGS Portugal, fundada em 1922 por o Grupo SGS, dedicava-se originalmente ao controlo de operações de carga e descarga de cereais a granel e, hoje em dia, disponibiliza uma variedade de serviços nas áreas de inspeção, verificação, ensaios e testes laboratoriais, consultoria e certificação [9]. Possui também laboratórios acreditados nas áreas Alimentar (frescos, processados, comida para bebés e alimentação de animais), Agrícola e Mineral (solos, águas de rega, folhas e raízes), Ambiental (ar e águas), DPH's (detergentes e produtos de higiene), Dispositivos Médicos, Produtos Químicos e Petrolíferos e Ensaios Não Destrutivos.

Os setores Agrícola e Alimentar são considerados os mais importantes do mercado porque são os que os consumidores têm uma preocupação acrescida da qualidade e segurança dos mesmos. Assim, a SGS Portugal permite gerir os riscos dos negócios dos fabricantes e fazer com que cumpram todas as obrigações, legislações e normas, enquanto protege os consumidores dos produtos, garantindo sempre a qualidade dos mesmos desde a sua produção, armazenamento até ao transporte final.

Em Portugal, o nível de referência para a presença de Acrilamida em géneros alimentícios entrou em vigor a 11 de Abril de 2018, data a partir do qual a SGS Portugal começou a realizar ensaios de quantificação para este analito [10].

1.4. Estrutura da Dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em duas partes, uma teórica e uma prática.

A parte teórica da dissertação encontra-se exposta no capítulo do estado da arte, onde são abordadas todas as informações relevantes da acrilamida, da sua formação nos alimentos e os principais fatores que influenciam a sua formação, os alimentos ricos em acrilamida e os respetivos níveis de referência, bem como a sua toxicidade. É apresentado, também, a teoria onde o método analítico para a quantificação de acrilamida se assenta, desde a preparação da amostra até à sua análise. Por fim, na parte teórica da estrutura apresentada, é apresentado tudo o que a validação do método analítico se baseia, desde o planeamento da validação do mesmo até aos parâmetros que caracterizam a mesma validação.

A parte prática da dissertação subdivide-se na demonstração dos resultados, obtidos ao longo do estudo efetuado, pelas matrizes avaliadas com a respetiva validação do método analítico correspondente, e na apresentação dos materiais utilizados e nos métodos extrativos aplicados.

2.1. Acrilamida

A acrilamida é um sólido cristalino, não volátil e incolor. Este composto orgânico com baixa massa molecular (71,08 g/mol), ponto de fusão de 84,5°C e altamente hidrossolúvel (2g/mL) forma-se a partir dos compostos asparagina e açúcares, naturalmente presentes em cereais, batatas, pão, café, entre outros, quando estes são preparados a temperaturas superiores a 120°C e com baixa humidade, ou seja, quando são cozidos, fritos ou assados [4]. Este contaminante decompõe-se na presença de ácidos, bases, agentes oxidantes e sais de ferro. Atualmente pode ser sintetizada em laboratório através da hidrólise do acrilonitrilo pela nitril hidrase [11].

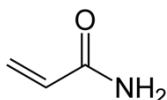


Figura 2.1 - Estrutura molecular da acrilamida

2.1.1. Formação da Acrilamida nos alimentos

A acrilamida é um contaminante que pode ser formado por três reações independentes, sendo elas, as reações de Maillard, de pirólise da carnosina e por via dos lípidos, cada uma depende principalmente da composição nutricional dos alimentos [12] [13].

A reação de Maillard 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). O composto 3-APA na presença de açúcar dá origem à acrilamida. Um produto secundário da descarboxilação da base de *Schiff* é o composto 3-oxopropanamida [14].

A formação de acrilamida através da via dos lípidos é uma das reações químicas que ocorre durante o aquecimento dos alimentos e é através deste processo que os lípidos podem dar origem à acroleína, que posteriormente por oxidação origina ácido acrílico ou um radical acrílico intermediário. Tanto o ácido acrílico como o radical acrílico intermediário na presença de amónia, proveniente da decomposição dos aminoácidos, formam acrilamida [14].

A reação de pirólise da carnosina origina ácido acrílico, que por sua vez forma acrilamida como acontece da reação por via dos lípidos com a diferença que a carnosina está presente em apenas determinados grupos de alimentos, como por exemplo na carne, não sendo a via mais frequente [13].

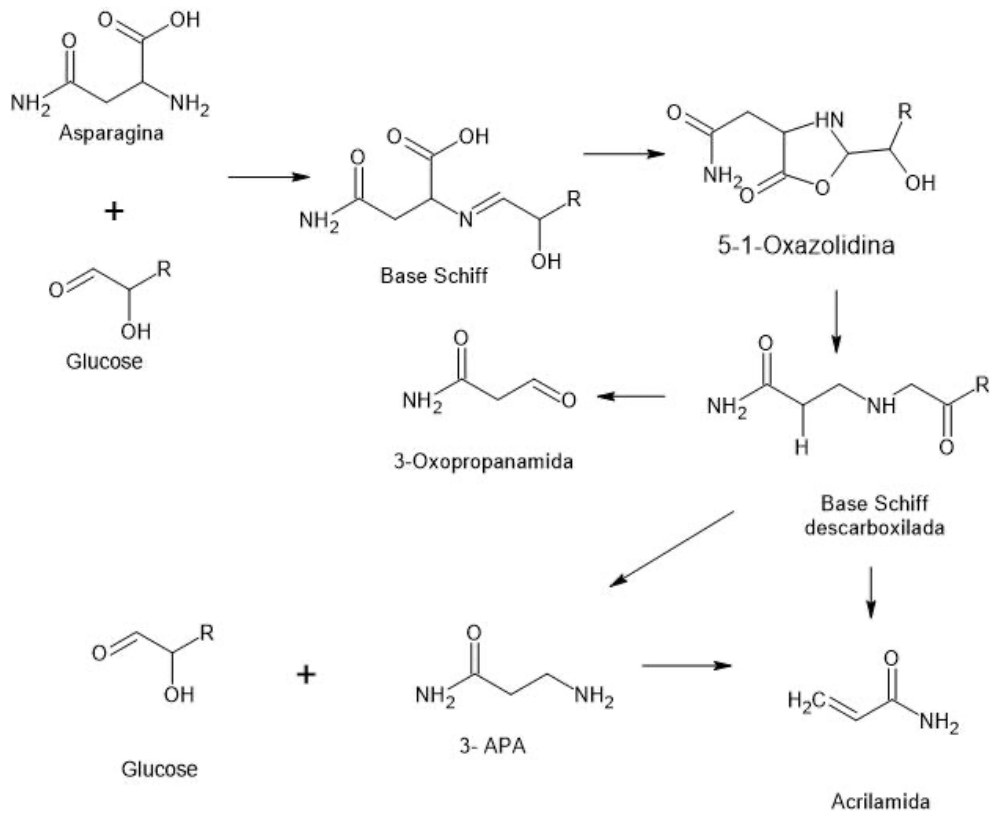


Figura 2.2 - Mecanismo de formação pela reação de Maillard

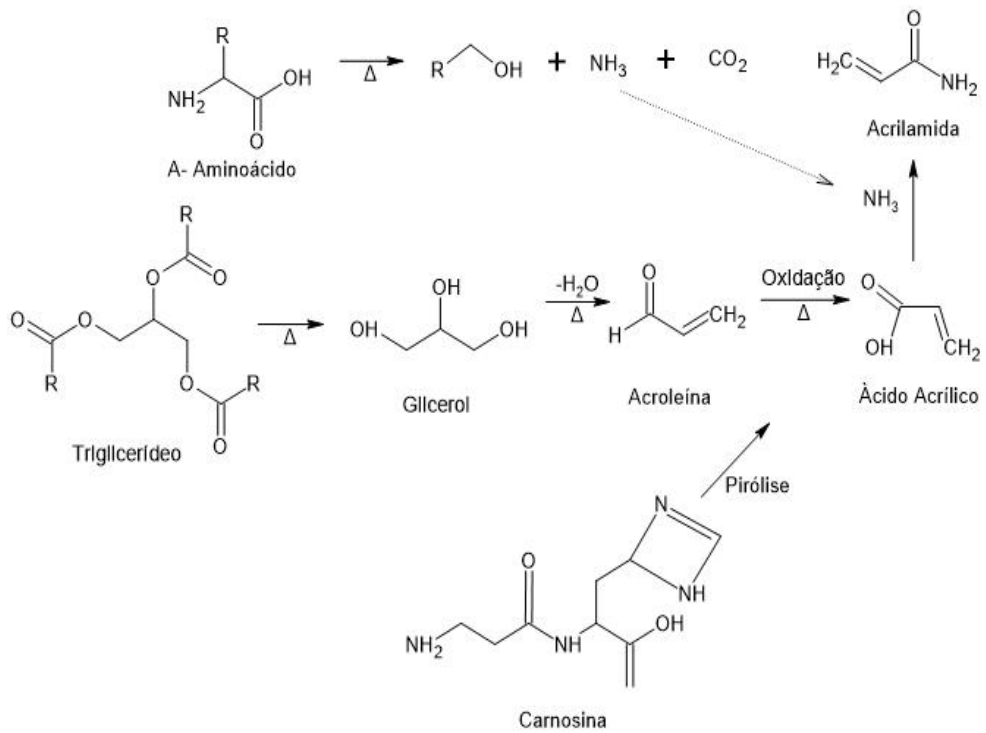


Figura 2.3 - Mecanismo de formação por via dos lípidos e da carnosina

2.1.2. Principais fatores que influenciam a formação da acrilamida

A descoberta que a formação de acrilamida nos alimentos ricos em hidratos de carbono através do aquecimento dos mesmos, pode chegar a teores bastante elevados, como miligramas por quilograma, causou um alarmismo na sociedade.

Os fatores que afetam principalmente as reações químicas em alimentos são a temperatura, a duração do período de aquecimento, o pH, as concentrações e interação dos componentes presentes e a concentração de água [15].

Tanto a concentração inicial dos precursores, a temperatura e a duração do processo aumentam proporcionalmente com a concentração de acrilamida, ou seja, com o aumento destes fatores o teor de acrilamida aumenta também no produto final [15] [16].

A concentração de água aumenta inversamente, ou seja, os alimentos com maior concentração de água em relação a outro, o alimento que irá ter um maior teor de acrilamida será o que terá um menor teor de água [16].

Um pH ácido durante o processamento irá provocar uma diminuição da formação de acrilamida no alimento [16] [15].

Os teores de acrilamida podem ser diminuídos através de uma abordagem de mitigação, como a implementação de boas práticas de higiene e a aplicação de procedimentos baseados nos princípios da Análise de Perigos e de Pontos Críticos de Controlo (HACCP) [17].

2.1.3. Alimentos ricos em Acrilamida e nível de referência

A acrilamida é definida como um contaminante pelo Regulamento (CEE) nº 315/93 do Conselho, e por tanto, foi necessário a regulamentação dos seus níveis nos géneros alimentícios onde está habitualmente presente. Atualmente, os níveis de referência de exposição à acrilamida são os seguintes.

Tabela 2.1 - Níveis de referência para a presença de acrilamida nos géneros alimentícios referidos [18](Parte 1/2)

Género Alimentício	Nível de referência [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Batatas fritas (prontas a comer)	500
Batatas fritas de pacote fabricadas com batatas frescas e com massa de batata; Bolachas salgadas à base de batata; Outros produtos de batata à base de massa de batata	750
Pão fresco à base de trigo	50
Pão fresco, excluindo pão à base de trigo	100
Cereais à base de farelo e cereais integrais, grãos tufados pelo processo de <i>gun puffing</i>	300
Cereais à base de trigo e de centeio ⁽¹⁾	300

Tabela 2.1. – Níveis de referência para a presença de acrilamida nos géneros alimentícios referidos (Parte 2/2)

Género Alimentício	Nível de referência [µg/kg]
Cereais à base de milho, aveia, espelta, cevada e arroz ⁽¹⁾	150
Bolachas e <i>wafers</i>	350
Bolachas salgadas com exceção das bolachas à base de batata	400
Pão estaladiço (<i>knackebrot</i>)	350
Pão-de-espécie	800
Produtos semelhantes aos outros produtos desta categoria	300
Café torrado	400
Café instantâneo (solúvel)	850
Sucedâneos do café exclusivamente a partir de cereais	500
Sucedâneos do café obtidos a partir de uma mistura de cereais e chicória	(2)
Sucedâneos do café obtidos exclusivamente a partir de chicória	4000
Alimentos para bebés, alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças pequenas, exceto bolachas e tostas ⁽³⁾	40
Bolachas e tostas para lactentes e crianças pequenas ⁽³⁾	150
Café torrado	400
Café instantâneo (solúvel)	850
Sucedâneos do café exclusivamente a partir de cereais	500
Sucedâneos do café obtidos a partir de uma mistura de cereais e chicória	(2)
Sucedâneos do café obtidos exclusivamente a partir de chicória	4000

(1) Cereais não integrais e/ou não à base de farelo. O cereal presente em maior quantidade determina a categoria.

(2) O nível de referência a aplicar aos sucedâneos do café obtidos a partir de uma mistura de cereais e chicória tem em conta a proporção relativa destes ingredientes no produto final.

(3) Conforme definidos no Regulamento (UE) n° 609/2013

2.1.4. Toxicidade da acrilamida

Ao longo dos últimos anos, a acrilamida tem sido alvo de vários estudos científicos, nomeadamente da sua toxicidade, efeitos nos humanos, metabolismo, cinética das suas reações e do modo de ação. Dados disponíveis de exposição acidental ou de envenenamento através da acrilamida revelam que esta pode ser rapidamente absorvida por via oral, inalatória ou dérmica, espalhando-se pelo corpo a uma velocidade elevada independentemente da via de administração.

Com base em estudos realizados em animais, o Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM) da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (ASAE) confirma avaliações anteriores de que a acrilamida nos géneros alimentícios aumenta potencialmente o risco de desenvolvimento de cancro assim como de mutações genéticas nos consumidores de todas as faixas etárias, sendo as crianças o grupo etário mais exposto a este efeito devido ao seu peso corporal.

Pode-se concluir que a acrilamida é um composto bastante tóxico para o nosso organismo, no entanto, a Organização Mundial de Saúde verificou que a quantidade que seria necessário ingerir para se observar neuropatia, 0,5 mg por kg de massa corporal por dia, é 500 vezes superior à quantidade média que é ingerida, e 2000 vezes superior para manifestar problemas de fertilidade. Assim, concluiu que os níveis de acrilamida nos alimentos são seguros no que diz respeito a neuropatia, porém poderão ser preocupantes em termos de efeitos carcinogénicos em humanos, e é recomendado a redução da sua ingestão para os níveis mais baixos possíveis [19].

Por fim, este contaminante foi classificado como um carcinogéneo do Grupo 2A, provável carcinogénico para humanos, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC), e um carcinogéneo de Categoria 2B e um mutagénico de Categoria 2C, pela União Europeia [20].

2.2. Método analítico para a quantificação da acrilamida

A análise a componentes individuais em alimentos é por norma uma tarefa difícil que requer técnicas analíticas sofisticadas, pois estas matrizes constituem normalmente uma mistura complexa e heterogénea de grande variedade de substâncias químicas.

A quantificação da acrilamida é geralmente obtida com recurso a técnicas cromatográficas, tanto de cromatografia líquida como de cromatografia gasosa. Comum a ambas as técnicas é a utilização de detetores de massa, o que se justifica pela complexidade das matrizes analisadas, fenómeno presente em qualquer análise de constituintes alimentares, e pelos elevados níveis de sensibilidade exigidos.

A dificuldade analítica associada à determinação deste analito deve-se principalmente aos fatores relacionados com a molécula da acrilamida, como a baixa massa molecular, a elevada polaridade, que consequentemente dificulta a extração de matrizes aquosas por solventes orgânicos convencionais, as más propriedades cromatográficas e a dificuldade de deteção da molécula, devido à ausência de propriedades adequadas à generalidade dos detetores cromatográficos mais usados.

2.2.1. Preparação da Amostra

A implementação de métodos cromatográficos exige, geralmente, diversas etapas prévias que constituem o processo de preparação das amostras. O principal objetivo deste processo é transferir o analito em estudo da matriz original para um extrato orgânico, o mais possível isento de interferentes, passível de ser analisado pela instrumentação analítica selecionada.

O processo de preparação da amostra engloba várias etapas, das quais o tipo e o número de etapas dependem do tipo de matriz e da técnica cromatográfica usada. As etapas podem ser generalizadas em pulverização e homogeneização da amostra, hidratação da amostra, extração da acrilamida, purificação e concentração dos extratos e derivatização do composto [21].

A escolha adequada de uma técnica de preparação de amostras é um fator importante para obter resultados confiáveis e exatos, sendo necessário selecionar técnicas e condições experimentais cuidadosamente. A seleção depende de fatores como a natureza da amostra, a matriz utilizada, as características do analito e a técnica analítica.

Pulverização e Homogeneização da amostra

A homogeneização da amostra constitui o passo inicial de qualquer processo analítico e tem como objetivo a mistura correta de todos os seus componentes. No caso de amostras sólidas é geralmente necessário proceder à redução do tamanho das partículas, o que se consegue à custa de operações que incluem cortar, quebrar e pulverizar a matriz.

Durante a pulverização e homogeneização da acrilamida é preciso um certo cuidado, visto que é na superfície dos alimentos que esta substância normalmente tem concentrações mais elevadas por estar mais exposta às fontes de calor. Posto isto, é necessário na toma da amostra ter em atenção às proporções de todas as partes do alimento para a análise ser representativa, exceto quando se pretende analisar uma parte específica do alimento.

Hidratação da amostra

À posteriori das etapas de homogeneização e pulverização, anteriormente descritas, as generalidades dos esquemas analíticos propõem uma etapa de extração com água, dada a grande polaridade da acrilamida.

A hidratação da matriz é essencial para uma correta extração da substância, no entanto, o uso de água co extrai a generalidade dos componentes maioritários, tais como açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, etc. Para amostras líquidas, como leite, café, bebidas à base de chocolate, entre outras, que já contenham água, a etapa de extração aquosa é desnecessária.

A etapa de adição de água é efetuada geralmente à temperatura ambiente, no entanto, alguns autores aconselham o uso de água aquecida a temperaturas até 80°C, uma vez que a acrilamida é relativamente estável a essa temperatura e o rendimento poderá ser razoavelmente maior.

Extração da Acrilamida por outros compostos

A extração da acrilamida é das etapas mais importantes e complexas do processo de preparação da amostra, que tanto pode ser efetuada apenas com água como por outras soluções.

Alguns autores sugerem a utilização de soluções concentradas de cloreto de sódio, de modo a evitar a formação de emulsões durante a purificação das amostras, soluções aquosas ácidas, de modo a aumentar o rendimento de extração com um pH mais ácido, e solventes orgânicos, o que diminui a co extração dos componentes maioritários.

Como métodos de extração alternativos, a extração líquida pressurizada (PLE) é uma técnica que consiste em extrair amostras sólidas e semissólidas com solventes líquidos convencionais a temperaturas e pressões elevadas para aumentar a eficiência do processo, e que permite a extração da acrilamida de uma forma rápida e automatizada de várias amostras num curto espaço de tempo.

Outra alternativa é a extração em fase sólida (SPE) que tem o mesmo princípio de que a cromatografia, ou seja, o comportamento cromatográfico da acrilamida e dos interferentes ajudam na escolha do sorvente e do eluente adequado para a extração, tem um menor consumo de solvente orgânico, não forma emulsões, apresenta altas percentagens de recuperação do analito e é capaz de aumentar seletivamente a concentração do mesmo, tendo também associada facilidade de automação.

Purificação dos extratos

A presença de interferentes pode resultar numa variedade de problemas, incluindo a formação de emulsões, a incorreta separação cromatográfica, a possibilidade de contaminação do equipamento e, conseqüentemente, a diminuição do rendimento global do método.

A remoção de interferentes pode ser realizada por intermédio de operações de purificação, que podem ser de diferentes tipos, sendo os mais comuns a precipitação seletiva de proteínas e de hidratos de carbono, processos de extração em fase sólida e da adição de etapas de extração líquido/líquido.

Derivatização do composto

Esta etapa é usualmente aplicada em técnicas analíticas de cromatografia gasosa, sendo as principais vantagens da derivatização da acrilamida a formação de um composto relativamente mais volátil, menos polar e com maior massa molecular, logo com melhor comportamento cromatográfico e mais facilmente detetável por espectrometria de massa. O aumento de seletividade assim alcançado compensa o facto de se tratar de um processo demorado e o facto de o derivado formado poder ser extraído no final com um solvente orgânico permitindo a obtenção de extratos finais isentos de compostos polares representa outra vantagem desta etapa.

Para análises de cromatografia gasosa a molécula da acrilamida é, normalmente, derivatizada por bromação para formar a 2,3-dibromopropionamida que apresenta melhores propriedades cromatográficas. O derivado bromado é facilmente identificado pelo seu tempo de retenção e pela razão de iões de massa característicos.

2.2.2. Análise da Acrilamida

Como já foi referido anteriormente, a análise da acrilamida é realizada através de técnicas cromatográficas. A cromatografia é uma técnica quantitativa que tem por base a separação e purificação de amostras e identificação de substâncias específicas em misturas complexas.

Através das propriedades das substâncias, como solubilidade, afinidade, tamanho e massa, é realizada a separação dos componentes, fazendo com que a mistura onde estes estão presentes passe por duas fases, uma estacionária e outra móvel, e com a interação dos componentes e as fases, por meio de forças iónicas e intermoleculares, a separação é realizada.

A mistura pode ser separada em várias partes distintas, ou ser purificada com a eliminação de interferentes. Para a identificação dos componentes presentes na mistura são comparados os resultados da análise com resultados previamente conhecidos, sendo possível identificar a substância presente na mistura através das semelhanças das análises [22].

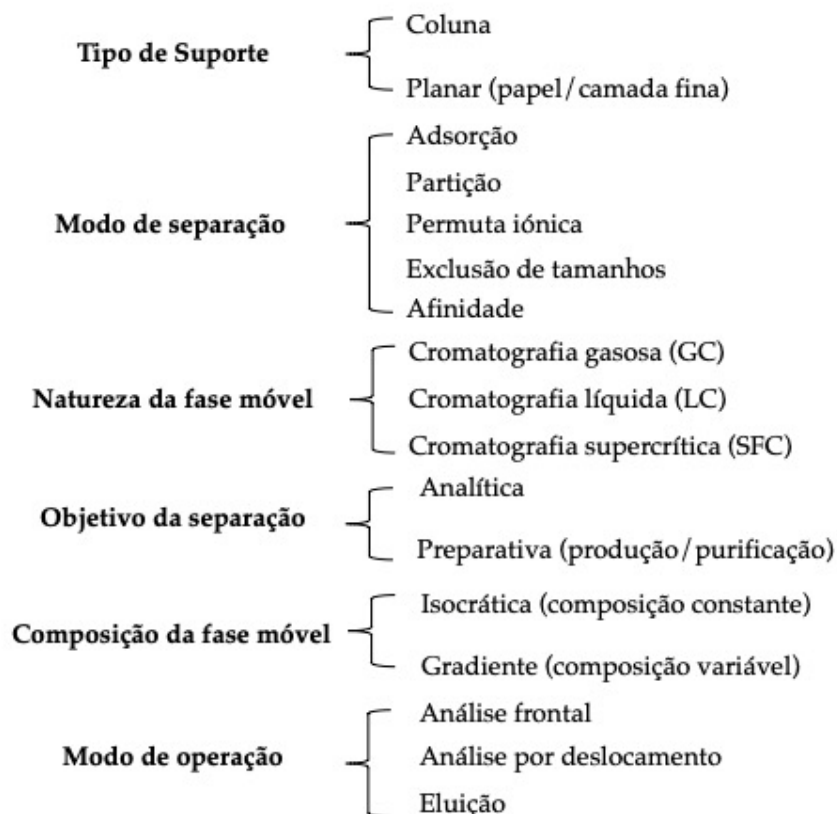


Figura 2.4 - Classificação da cromatografia Adaptado de

2.2.3. Princípios da Cromatografia

A cromatografia pode ser classificada quanto à forma física do sistema cromatográfico, à fase móvel e estacionária empregue e quanto ao modo de separação.

A cromatografia é uma importante técnica biofísica que engloba uma ampla diversidade de metodologias de separação baseadas na distribuição dos componentes de uma mistura entre um fluido, fase móvel ou eluente, e um adsorvente, fase estacionária. A fase móvel pode ser um gás, no caso da cromatografia gasosa, um líquido, no caso da cromatografia líquida, ou um fluido supercrítico, no caso de cromatografia supercrítica. A fase estacionária pode ser um líquido ou um sólido, sendo o estado sólido o que é mais usual.

À medida que os compostos são separados e detetados originam uma série de sinais em função do tempo que são representados sob a forma de um cromatograma através de uma espécie de gráfico, onde cada sinal representa a distribuição de um componente eluído na fase móvel.

Os parâmetros que caracterizam principalmente um cromatograma são o tempo de retenção, a resolução e a intensidade do sinal.

2.2.4. Cromatografia Líquida (LC)

A cromatografia líquida foi inventada pelo russo *Mikhail S.Tswett*, considerado o pai da cromatografia, no início do ano de 1900, e surgiu durante as suas pesquisas sobre a clorofila, na tentativa de separar os pigmentos de folhas, extraídos de plantas, e utilizando um solvente numa coluna empacotada com partículas de carbonato de cálcio. Atualmente, é uma técnica mais sofisticada e rigorosa, e desde o ano de 1970 que os moldes da cromatografia líquida moderna surgiram diferenciando-se da cromatografia em coluna sendo aperfeiçoada até à cromatografia de alta eficiência [23].

A cromatografia tem diversas aplicações como método de separação, sendo a cromatografia líquida empregue normalmente em análises de quantificação alimentar, cosméticos, amostras forenses, matrizes ambientais e no âmbito de química industrial, para além disso, pode ser empregue para purificar produtos farmacêuticos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, esteroides e proteínas. Inicialmente, a amostra é injetada na coluna através de uma microseringa, no caso da cromatografia analítica, ou de uma válvula de injeção, no caso de sistemas preparativos, e é homoganeamente distribuída no topo da coluna. De seguida, a fase móvel transportando a amostra é forçada a percolar através da coluna por uma ação externa, que tanto pode ser a simples força da gravidade como uma força mais intensa gerada por uma bomba.

Durante o processo de percolação os componentes migram com velocidades diferentes e são identificados à saída da coluna num detetor que fornece um registo contínuo da composição da amostra analisada, em formato de um cromatograma. Os detetores mais usados são os fotométricos, de fluorescência, sensíveis a espécies que fluorescem, e os de índice de refração [24].

2.2.5. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) assenta nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e foi desenvolvida com o objetivo de obter uma maior eficiência na separação de compostos. Caracteriza-se pelo uso de colunas em aço inoxidável com um diâmetro interno na ordem dos 2 mm, um empacotamento de micropartículas com dimensões inferiores a 2 μm e uma pressão que ronda os 1300 bar.

É uma técnica que trouxe muitas vantagens em relação à separação cromatográfica de analitos por utilizar colunas com um comprimento mais reduzido, as partículas que constituem a fase móvel são de dimensões inferiores, o fluxo das amostras que passam na fase estacionária pode ser mais elevado tal como a pressão a que o sistema opera e o consumo de solvente durante a análise é relativamente inferior. Para além das vantagens durante a análise supramencionadas, o cromatograma apresenta um maior grau de separação entre os picos, logo uma maior resolução e sensibilidade de deteção dos compostos presentes nas amostras. Em resumo, o englobar de todas as vantagens resultam numa redução do tempo de análise, sendo um dos fatores principais para a aplicação deste método na quantificação de acrilamida [25] [26].

Sistema UPLC

O sistema UPLC é caracterizado pelo conjunto de componentes que estão presentes num único aparelho e que permite a identificação dos diferentes compostos presentes numa amostra, associado a um tempo e custos mais reduzidos. É constituído por um sistema binário ou quaternário de solventes, um sistema de injeção da amostra, uma bomba, uma coluna cromatográfica e a respetiva fase estacionária [27].

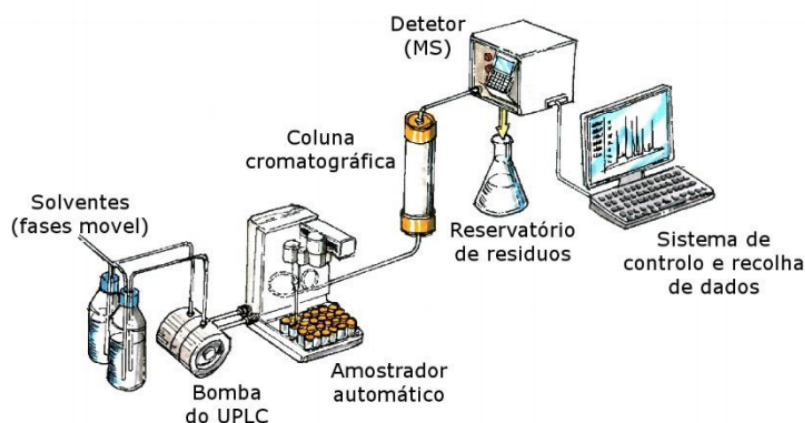


Figura 2.5 - Sistema UPLC

Bomba

A principal função da aplicação bomba de alta pressão no sistema UPLC é fazer com que a fase móvel passe na coluna a fluxo desejado, que normalmente ronda a ordem dos mililitros por minuto.

O bombeamento da fase móvel para passar na fase estacionária pode ser realizada em proporção constante, isocrática, ou em proporção variável, gradiente. Quando o sistema opera no método isocrático as composições da fase móvel mantêm-se constantes durante toda a análise, ou seja, a percentagem de A e de B é exatamente igual durante todo o processo da separação cromatográfica. No método de gradiente a percentagem de fase móvel A e fase móvel B não é a mesma durante todo o processo de separação cromatográfico, variando gradualmente a composição da fase móvel por aumento e, posterior, diminuição de percentagem de solvente orgânico móvel ao longo do processo cromatográfico [28].

Sistema de Injeção

Todo o processo de separação cromatográfica inicia-se quando a amostra é injetada juntamente com a fase móvel no início da coluna. A amostra é bombeada e percorre a coluna de com o objetivo de separar os analitos presentes na mesma. O injetor é responsável pela introdução da amostra na fase móvel, que está continuamente a passar na coluna do sistema de cromatografia líquida.

A injeção da amostra no sistema UPLC é realizada, por norma, de forma automática num curto intervalo de tempo e a um fluxo contínuo, de modo a proteger a coluna de flutuações resultantes da utilização de altas pressões. O volume de injeção deve ser reduzido para evitar a expansão do pico cromatográfico, e, normalmente, varia entre 0,1 a 50 μL .

Coluna Cromatográfica

As colunas cromatográficas utilizadas na cromatografia líquida possuem um comprimento e diâmetro interno variável, e são constituídas por um material de empacotamento específico para a separação dos componentes. Este material de empacotamento da coluna, também designado por fase estacionária, é constituído por pequenas partículas porosas esféricas com uma superfície específica variável ou por um líquido específico, com um elevado potencial de separar os componentes capaz de suportar pressões superiores a 965 bar, aproximadamente. A gama do tamanho das partículas, constituintes da fase estacionária, varia, habitualmente, entre 3 a 10 μm , e no caso de sistemas UPLC pode ser inferior a 2 μm , quanto à sua composição estas podem ser constituídas por diversos materiais que vão influenciar o tipo de separação dos compostos [29].

Todas as colunas cromatográficas possuem uma temperatura específica de operação, para que não ocorra uma potencial degradação da fase estacionária ou alteração da composição da fase móvel, podendo estas serem aquecidas ou arrefecidas, proporcionando uma maior eficiência de separação, sendo que a maioria trabalha à temperatura ambiente.

Relativamente à coluna de separação em si, esta pode ser caracterizada de acordo com a composição das partículas ou da sua polaridade, ambas variam de acordo com os compostos que pretende identificar e quantificar. A coluna cromatográfica utilizada durante o estudo é constituída por partículas de carbono grafite poroso, aplicada a cromatografias de fase reversa, onde a separação dos compostos é feita com base na partição de moléculas entre a fase estacionária e a fase móvel.

As partículas de carbono grafite poroso são esféricas e totalmente porosas, contendo uma superfície cristalina e altamente reprodutível, sem micro poros. A nível molecular o carbono grafite poroso é composto por folhas planas de átomos de carbono dispostos hexagonalmente ligados por ligações conjugadas na ordem dos 1,5 Å, sendo esta uma característica das moléculas de hidrocarbonetos aromáticas polinucleares de grandes dimensões. Os solutos de grande polaridade demonstram uma alta afinidade em relação à superfície da grafite, o que permite

obter uma boa retenção e eluição de espécies polares, o que não se verifica com as colunas tradicionais de sílica [30].

As principais vantagens da utilização da coluna *Hypercarb* são a retenção excepcional de analitos muito polares, separação para substâncias estruturalmente relacionadas, estabilidade de pH de 0 a 14, que não é afetado por fases móveis agressivas, e é uma solução ideal para aplicações de alta temperatura [31].

A fase móvel da coluna em questão opera em modo gradiente, sendo a fase móvel A bombeada a uma percentagem de 95% e a fase móvel B a uma percentagem de 5% até aos 4 minutos da corrida, e depois a fase móvel B é bombeada a 98% e a fase móvel A a 2% durante dois minutos e 10 segundos e, por fim, a fase móvel A e B voltam às condições iniciais de bombeamento, com um fluxo de 0,5 mL/min, o volume de injeção é de 25 μ L, e a coluna opera a 60°C.

2.2.6. Espectrometria de Massa (MS)

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa dá origem a uma das metodologias analíticas com maior seletividade, indicada para a identificação de compostos em matrizes de natureza e complexidade diversas, ou nos respetivos extratos. A técnica LC-MS/MS produz informação a nível bidimensional, por considerar o tempo de retenção do composto e registar a informação espectral do eluído a dado momento.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica física que tem como finalidade a deteção e identificação de moléculas específicas através da ionização dos analitos, ou seja, a amostra é fragmentada em moléculas, posteriormente são avaliadas com precisão as massas específicas dos átomos das respetivas moléculas e é efetuada a sua quantificação. O analisador de espectrometria de massa é constituído por uma fonte de ionização, um analisador, um detetor e um sistema de dados [32] [33].

A espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) é constituída por dois espectrómetros de massa, onde no primeiro ocorre a separação dos componentes da amostra por carga, e seguem posteriormente para a câmara de colisão onde são fragmentados e, os respetivos fragmentos viajam até ao segundo espectrómetro, onde são analisados e identificados de acordo com a relação massa/carga (m/z). Quando um analisador é constituído por dois espectrómetros, com uma câmara de colisão entre eles, é aplicado o termo *tandem*, sendo o primeiro analisador o identificador do ião precursor e o segundo analisador do ião produto [34].

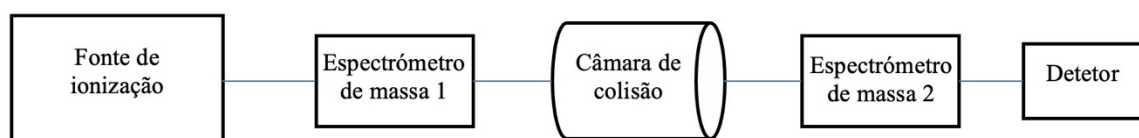


Figura 2.6 - Esquema de um sistema de espectrometria de massa em *tandem*.

A fonte de ionização, onde os componentes da amostra são convertidos em iões através de um agente ionizante, mais adequada para a análise de acrilamida é a ionização por *elec-*

trospray (ESI). A produção de íões baseia-se, em primeiro lugar, na dispersão de gotas altamente carregadas, à pressão atmosférica, e, posteriormente, na construção de condições que permitam a evaporação do solvente [33].

As principais vantagens da ESI são a elevada sensibilidade, o consumo reduzido de amostras, a análise atinge uma ampla variedade de moléculas, para além de ter um mecanismo de utilização simples. É uma técnica de ionização capaz de produzir íões de carga múltipla, reduzindo a razão m/z e possibilitando a análise de compostos de elevada massa molecular, as amostras analisadas são introduzidas no sistema através de uma solução, permitindo assim o acoplamento desta técnica de ionização a várias técnicas de separação, e a ESI provoca pouca ou quase nenhuma fragmentação dos analitos em estudo, sendo considerada uma técnica de ionização branda [35].

A ionização por *electrospray* baseia-se no gradiente elétrico, produzido pela voltagem existente entre o capilar e o eléctrodo, que separa as cargas na superfície do fluido que passa no capilar, forçando o líquido a sair da agulha com um cone de Taylor.

No analisador de massas é onde ocorre a separação dos íões de acordo com a razão massa/carga de cada uma. O analisador quadrupolo é o analisador mais utilizado devido à sua robustez, facilidade de manipulação, por conseguir suportar pressões relativamente altas, apresentar uma boa linearidade numa gama larga de concentrações em análises quantitativas, e são instrumentos normalmente de baixo custo [33]. Cada analisador do tipo quadrupolo utiliza um campo elétrico oscilante, gerado por quatro barras metálicas com dois polos negativos e dois polos positivos, dispostos alternadamente, sendo a secção dos quatro polos circular.

O analisador do tipo triplo quadrupolo, é constituído por três quadrupolos em série, e que combina uma corrente contínua com potenciais aplicados a uma determinada frequência, de forma a seleccionar os íões que vão para a câmara de colisão. No primeiro quadrupolo são seleccionados os íões precursores, que após serem transferidos para o analisador, segundo quadrupolo ou câmara de colisão, são fragmentados em resultado da interação com o gás de colisão, azoto, para originar os íões produtos. Os íões produtos originados são direccionados para o terceiro quadrupolo onde são separados de acordo com a sua razão massa/carga [35].

Por fim, é no sistema de deteção e processamento que ocorre a transformação da corrente de íões em sinal eléctrico, e onde o sinal obtido é amplificado de modo a ser processado pelo computador criando, assim, o cromatograma correspondente.

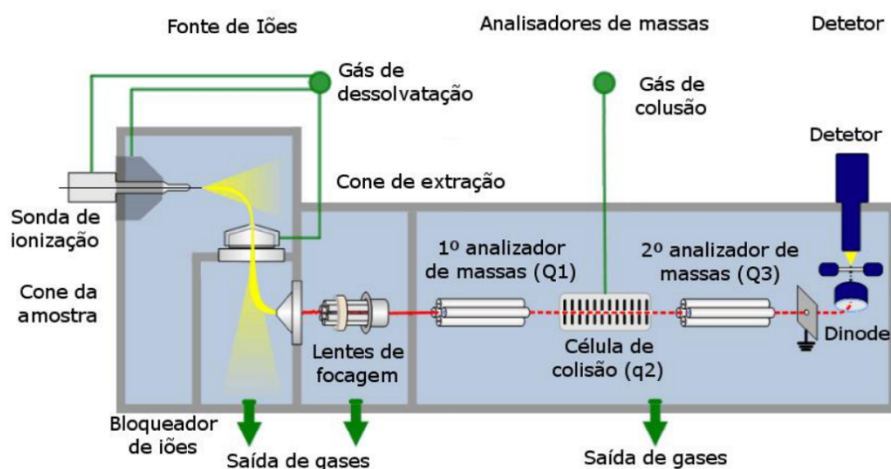


Figura 2.7 - Esquema de um espectrómetro de massa de triplo quadrupolo usado em cromatografia líquida

As condições cromatográficas adotadas para a validação do método analítico encontram-se na tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Condições cromatográficas do método analítico.

Parâmetros	Condições Cromatográficas		
Modo de ionização	ESI		
Coluna	Hypercarb 2,1x100 mm (35005-102130) Marca: Thermo Fisher Scientific		
Temperatura do forno da coluna	60°C		
Fase Móvel A	Água ultrapura + 0,1% de ácido fórmico		
Fase Móvel B	Metanol LC-MS + 0,1% de ácido fórmico		
Gradiente	Tempo (min)	A (%)	B (%)
	0	95	5
	3,0	95	5
	4,0	2	98
	6,0	2	98
	6,10	95	5
	7,5	95	5
Volume de injeção	25 µL		
Tempo de corrida	7,5 min		
Fluxo de injeção	0,500 mL/min		
Transições de massas	72>55; 72>44; 72>25		
Detetor	MS/MS		
Modo de separação	Fase Reversa		

2.2.7. Extração em Fase Sólida (SPE)

A extração em fase sólida foi introduzida em 1976 para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido e, hoje, é o método mais popular e utilizado diariamente para preparação de amostras, consiste na partição do analito entre duas fases, uma estacionária e a matriz da amostra líquida [36].

Existem duas estratégias que podem ser adotadas, uma quando o analito se encontra em concentrações baixas ou os interferentes apresentam polaridades distintas, e neste caso, a substância de interesse deve apresentar maior afinidade para a fase estacionária, comparativamente à solução em que está veiculada, para que possa ser removido do cartucho numa etapa seguinte de eluição, recorrendo a um solvente adequado, contrariamente, quando o analito se encontra em concentrações altas os interferentes da matriz devem ser adsorvidos fazendo com que o analito em interesse passe pelo cartucho sem ser retido. Os eluatos obtidos por este processo são frequentemente evaporados à secura sob uma corrente de gás inerte e aquecimento controlado, e o resíduo é feito num pequeno volume de solvente orgânico compatível com a metodologia de análise a executar [37].

A principal evolução da extração em fase sólida comparativamente à extração líquido-líquido convencional é a capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito, o que leva a altas taxas de recuperação do mesmo, no entanto este método extrativo acarreta algumas desvantagens como o tempo elevado de análise, os altos custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais multivias, *manifold*, a dificuldade na seleção do sorvente adequado e o facto de os cartuchos serem de utilização única, visto que estes têm uma baixa reprodutibilidade de lote para lote de cartuchos [38].

Etapas de um procedimento de extração de fase sólida

Condicionamento (A): realizado pela passagem sequencial de pequenos volumes de solventes, selecionados de acordo com a fase estacionária e a natureza matricial da amostra a extrair. Este processo prepara a fase estacionária para a interação da amostra com os seus componentes, com vista a promover a reprodutibilidade das condições de retenção dos analitos [39].

Retenção do analito (B): a passagem da amostra através da fase estacionária resulta na retenção dos compostos presentes para os quais exista afinidade, nomeadamente as substâncias de interesse e eventuais interferentes ou componentes da matriz [39].

Lavagem (C): após a passagem do volume especificado de amostra, um volume de solvente da mesma natureza é carregado através do cartucho com o objetivo de arrastar substâncias da matriz fracamente adsorvidas à fase estacionária [39].

Eluição (D): o cartucho é atravessado por um solvente para o qual os compostos apresentam afinidade, tendo a capacidade de captar e solubilizar os analitos adsorvidos à fase sólida, com as moléculas de interesse a serem recolhidas no eluato [39].

Tipicamente, um cartucho é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 30 a 60 μm de tamanho de partícula, fixado no tubo por meio de dois filtros com um determinado tamanho de poros. O cartucho Oasis MCX contém 150 mg de sorvente, sendo este um co polímero novo que foi otimizado para alcançar uma maior seletividade e sensibilidade na extração de compostos básicos com grupos de troca catiónica, constituído por partículas do tamanho de 30 μm . Os poros dos filtros têm um tamanho de 80Å.

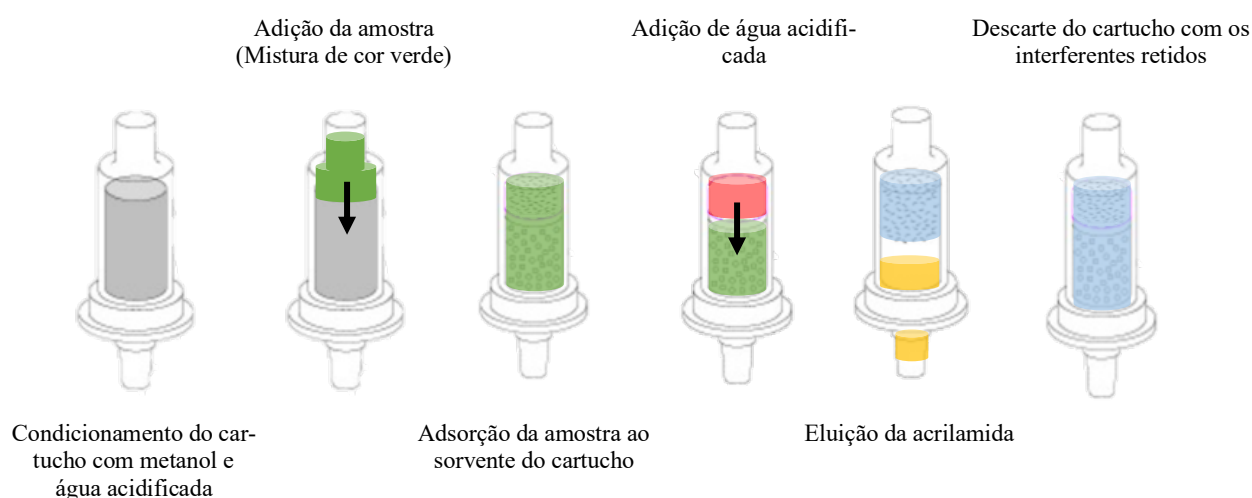


Figura 2.8 - Esquema do funcionamento da extração em fase sólida para amostras que contenham acrilamida

2.3. Validação do método analítico da quantificação de acrilamida

O desenvolvimento, adaptação e implementação de um método conhecido envolve uma avaliação de modo a estimar a sua eficiência na rotina do laboratório, processo designado por validação. Aquando do método escolhido, este passa a estar validado se as características associadas estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos, ou seja, a validação deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e a legislação aplicada ao método analítico.

O objetivo da validação do método analítico da quantificação de acrilamida é demonstrar que o mesmo é adequado para o seu propósito, ou seja, a validação visa garantir a qualidade dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões.

2.3.3. Planeamento da Validação do Método Analítico

Para a realização do planeamento e respetiva execução da validação de um procedimento analítico deve-se primeiro classificá-lo de acordo com os seguintes critérios, representados na tabela 2.2.

Tabela 2.3 - Classificação dos ensaios em função da sua finalidade.

Categoria	Finalidade do Teste
I	Determinação do princípio ativo, aplicado a medicamentos veterinários, matérias-primas, produtos para alimentação animal e matrizes de origem biológica.
II	Ensaio limite e determinação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos veterinários e matérias-primas.
III	Testes de desempenho, como por exemplo dureza, friabilidade, viscosidade, entre outros.
IV	Testes de identificação para ingrediente ativo, exemplificando pode ser feito através de espectroscopia no infravermelho.
V	Determinação de traços de fármacos em ração, exemplo contaminação cruzada.

De acordo com a classificação acima descrita a validação do método para a quantificação de acrilamida nos alimentos enquadra-se na categoria I, e como tal será atribuído os parâmetros mínimos de desempenho analítico, que serão estudados no capítulo seguinte, e devem ser determinados em função da sua categoria. A seguinte tabela indica os respetivos parâmetros a serem estudados em cada categoria.

Tabela 2.4 - Parâmetros a serem estudados na validação do método analítico em função da sua categoria atribuída. *Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

Parâmetro	Catego- ria I	Categoria II		Catego- ria III	Categoria IV	Categoria V
		Ensaio Limite	Quali- Quantita- tivo			
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	Sim
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Limite de Detecção	*	Não	Sim	*	Sim	Sim
Limite de Quantificação	*	Sim	Não	*	Não	Sim
Veracidade/Recupera- ção	Sim	Sim	*	*	Não	Sim
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim

A validação deve ser sempre considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações à metodologia já validada, fazendo com que o processo de revalidação do procedimento analítico seja ativado aquando de mudanças na composição do produto final, que possam interferir na resposta do procedimento analítico, ou de alterações nos próprios procedimentos analíticos e/ou especificações dos insumos, instrumentos ou equipamentos [40].

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação direta e por avaliação indireta. A avaliação indireta engloba a especificidade ou seletividade, curvas de calibração, limites analíticos, sensibilidade, reprodutibilidade, repetibilidade, precisão intermédia e robustez. A avaliação direta envolve a avaliação da exatidão, que foi realizado através de Material de Referência Certificado (MRC).

2.3.4. Especificidade / Seletividade

O principal objetivo em testar os parâmetros especificidade e seletividade é perceber se existem interferências no método analítico e a sua influência sob os resultados finais, pois as matrizes alimentares contêm interferentes que podem afetar o desempenho da quantificação da acrilamida [41] [42].

A seletividade baseia-se na capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa, sem a interferência dos outros componentes. O termo especificidade aplica-se quando o método permite discriminar o analito em particular relativamente aos interferentes [42] [41].

De modo a avaliar as interferências deverá ser realizado um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesmas matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções conhecidas e inserido na gama de trabalho. É de notar que as amostras devem ser analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade [41].

Em suma, um método analítico pode ser considerado específico e seletivo, ou seja, aplicável em rotina quando na prática se verificar que as taxas de recuperação se enquadram nos critérios de aceitação pré-definidos pelo laboratório de 60-140% , preferencialmente entre 70 a 120%. A equação para calcular a taxa de recuperação encontra-se abaixo.

Equação 2.1 – Taxa de Recuperação

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \times 100\%$$

Onde,

C_f = Concentração medida após a fortificação da matriz branca;

C_{nf} = Concentração medida na matriz branca não fortificada;

C_{ad} = Concentração do analito puro adicionado à matriz branca.

2.3.5. Curvas de Calibração

A calibração, em análises quantitativas, indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Deve ser sempre efetuada aquando da análise, devendo existir critérios para a aceitação das curvas de calibração relativos à linearidade e à estabilidade entre calibrações definidos internamente. A gama de concentrações das curvas de calibração deve contemplar toda a faixa de trabalho da rotina diária do laboratório, e deve ser feita através de, pelo menos, 5 pontos homogeneamente distribuídos na reta (≥ 5 pontos) [41] [40].

O procedimento para a construção das curvas de calibração para o processo analítico está representado no fluxograma abaixo.

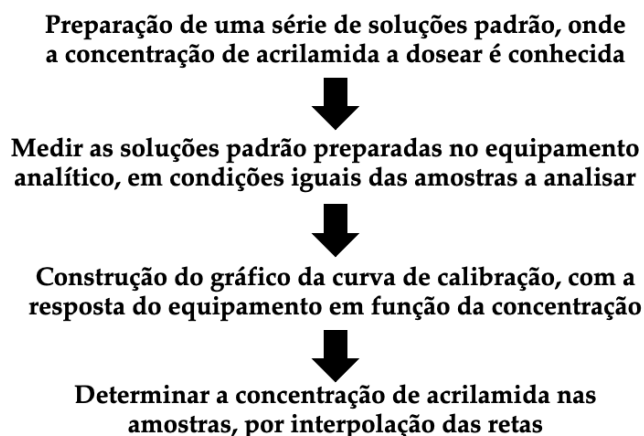


Figura 2.9 - Fluxograma alusivo ao procedimento da construção das curvas de calibração.

2.3.6. Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, em condições definidas, de modo a minimizar os efeitos de matriz. Existem duas medidas extremas para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade, e uma intermédia, denominada de precisão intermédia. Convém referir que geralmente a precisão varia com a gama de concentrações.

2.3.7. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do método analítico apenas poderia ser validada com a participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo, pois o equipamento será sempre o mesmo, os operadores e a época não influenciam o resultado final.

O objetivo principal da reprodutibilidade é averiguar a precisão de um método sobre diferentes condições de trabalho, o que não tem relevância na validação do método de quantificação de acrilamida por ser efetuado num laboratório de análises, uma vez que a intenção é implementar o método apenas no laboratório estudado, com o mesmo equipamento e pouca variação nas condições experimentais ao longo do tempo [42].

2.3.8. Repetibilidade

A repetibilidade traduz a precisão de um método de ensaio efetuado nas mesmas condições experimentais, mesmo laboratório, analista, reagentes, equipamentos, e num curto intervalo de tempo [41]. Para além disso, também se expressa através da dispersão de resultados e para ser determinada são exigidos, no mínimo 10 ensaios.

O limite de repetibilidade é um dos parâmetros que caracteriza a repetibilidade e é o valor máximo admissível para a diferença absoluta entre dois ensaios em condições de repetibilidade, para um nível de confiança de 95% [42].

Equação 2.2 - Limite de repetibilidade

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2}$$

Onde,

S_{ri} = Desvio padrão de repetibilidade, para cada nível i de concentração.

Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se a diferença entre os dois resultados consecutivos se situar abaixo do limite de repetibilidade. Caso a amplitude entre os dois ensaios seja superior ao limite, dever-se-á, numa primeira fase, fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição dos ensaios segundo um plano assente em dados bibliográficos ou normas [41] [42].

O coeficiente de variação de repetibilidade para cada nível de concentrações, expresso em percentagem, é dado por:

Equação 2.3 - Coeficiente médio de variação para a repetibilidade

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100\%$$

Onde,

\bar{x} = Média dos valores considerados.

2.3.9. Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi avaliada num contexto intralaboratorial, sobre amostras idênticas e variando apenas o tempo durante a precisão avaliada, mantendo, assim, certas condições tais como os equipamentos, o analista e o método de preparação das amostras. É a medida de precisão mais valorizada para a representatividade da variabilidade dos resultados dentro do mesmo laboratório.

De modo a determinar a precisão intermédia de um método, é necessário efetuar n medições em replicado, duplicado ou num ensaio único, sobre a amostra selecionada e nas condições pré-definidas [41].

A precisão intermédia pode ser expressa quantitativamente através da seguinte equação:

Equação 2.4 - Precisão Intermédia

$$S_{precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}{t(n-1)}}$$

Onde,

$S_{precisão}$ = Desvio padrão associado à precisão intermédia;

t = número de amostras ensaiadas;

n = número de ensaios efetuados por amostra, exemplo duplicado;

j = número da amostra, que vai de 1 a t amostras;

k = número do resultado obtido para a amostra j , que vai de 1 a n ensaios;

y_{jk} = resultado individual, k , para a amostra j , que vai de 1 a t ;

\bar{y}_j = representa a média aritmética dos resultados da amostra j , que vai de 1 a t .

2.3.10. Limites Analíticos

Os limites analíticos podem ser calculados através de diversas formas, sendo sugerido posteriormente as estudadas. Os limites são designados como limite de deteção e limite de quantificação, e devem ser atualizados sempre que ocorrem alterações que afetem o resultado final, tais como, reagentes, equipamento, método extrativo [41].

Limite de Detecção (L.D.)

O conceito de limite de detecção, num modo qualitativo, representa a concentração mínima possível de distinguir de uma amostra branco, ou seja, de uma amostra que não contenha acrilamida e que seja da mesma matriz. Na prática, o LD é o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito, com uma estatística razoável, qualquer resultado de acrilamida, possível de detetar, que se situe abaixo deste limite não significa, necessariamente, a ausência da mesma, pode indicar com uma probabilidade inferior que o resultado se encontra abaixo da gama possível de analisar [41] [40].

Em termos quantitativos o limite de detecção pode ser obtido através da expressão representada abaixo, assumindo uma distribuição normal dos erros e um nível de confiança de cerca de 99,7%, temos que:

Equação 2.5 - Limite de Detecção

$$\text{Limite de Detecção (L.D.)} = \frac{[3,3 \times S_{y/x}]}{b}$$

Onde,

$S_{y/x}$, corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração associada;

b, corresponde ao declive da curva de calibração associada.

Limite de Quantificação (L.Q.)

O conceito de limite de quantificação passa pela detecção da menor concentração de acrilamida a partir do qual é possível quantificar a mesma, ou seja, em termos práticos corresponde normalmente à menor concentração da curva de calibração, excluindo a amostra branco.

Este teste deve ser repetido para testar se os parâmetros precisão e exatidão são alcançados com sucesso, obtendo resultados concordantes [40] [41].

Quantitativamente o limite de quantificação é calculado através da seguinte expressão:

Equação 2.6 - Limite de Quantificação

$$\text{Limite de Quantificação (L.Q.)} = \frac{[10 \times S_{y/x}]}{b}$$

2.3.11. Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado.

Esta será a última fase de validação do método, portanto, a robustez pode ser testada nas mesmas condições estabelecidas na precisão intermédia, ou seja, variando apenas o tempo durante os testes de robustez, visto que as restantes condições se manterão constantes ao longo do tempo. Por fim, deverá ser feita uma análise final aos resultados obtidos de modo a concluir se o método é considerado robusto [41]

2.3.12. Exatidão

A avaliação direta tem em vista conhecer a exatidão dos métodos de ensaio através da concordância entre o valor de referência, considerado como verdadeiro, e o resultado obtido pela análise. Pode ser validado por materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais ou testes comparativos.

A exatidão está diretamente relacionada a erros sistemáticos e aleatórios, quando aplicada a um conjunto de resultados de ensaio.

A avaliação do parâmetro através dos materiais de referência certificados (MRC) foi efetuada pela determinação da concentração de acrilamida, com uma incerteza associada ao valor. Os MRC devem ser adquiridos a um fornecedor credível e reconhecido, onde seja atribuído valores certificados com as respectivas incertezas, de modo a estabelecer a rastreabilidade das medições químicas e permitir controlar a exatidão do método de análise em questão. Aquando da análise do MRC, se o valor obtido não se encontrar no intervalo respetivo à incerteza, o laboratório deverá procurar a origem da causa e tentar corrigi-la ou aceitá-la.

2.3.13. Efeito Matriz

A verificação do efeito matriz é um dos parâmetros mais importante para a validação e implementação de um método analítico na rotina do laboratório, porque pode existir medições não exatas do analito de interesse. O efeito matriz está diretamente associado à espectrometria de massa em *tandem* na análise a matrizes biológicas e acontece quando existe a presença de substâncias que coeluem com o analito de interesse e provocam uma alteração na eficiência da ionização do aparelho cromatográfico, esta alteração não é perceptível no cromatograma, no entanto tem um efeito prejudicial na sensibilidade e seletividade, pondo em causa a precisão, exatidão e robustez do método em questão [43].

De acordo com as características do aparelho cromatográfico e, conseqüentemente, do ambiente em que a ionização é efetuada, a eficiência da ionização, procedente da competitividade entre o analito de interesse e as moléculas interferentes, pode ser diminuída aquando da supressão de iões, ou ser aumentada, quando existe a intensificação dos mesmos [44].

O efeito matriz pode ser avaliado através do método de adição pós-extração ou pelo método de infusão pós-coluna, sendo que o método eleito para o cálculo do efeito matriz foi o método de adição pós-extração, que se baseia na comparação entre as amostras com padrão adicionado após a extração e a soluções com o analito de interesse em solvente, ambas com concentrações conhecidas e semelhantes [44].

A diferença entre a resposta da matriz com a adição de padrão após a extração e da solução com o analito em solvente, com concentração semelhante, dividida pela área do pico cromatográfico da solução em solvente determina o grau do efeito matriz que ocorre na acrilamida nas condições cromatográficas do laboratório, como é representado na equação seguinte. O valor ideal do efeito matriz é de 0%, que representa a ausência completa dos efeitos matriciais, valores que situem abaixo deste indicam a supressão dos iões e percentagens positivas indicam a intensificações dos iões [43].

Equação 2.7 - Efeito Matriz Percentual

$$EM (\%) = \frac{\text{Área do pico da amostra} - \text{Área do pico da solução em solvente}}{\text{Área do pico da solução em solvente}} \times 100$$

2.4. Procedimento Experimental

Para eleger o procedimento experimental mais adequado, com uma taxa de recuperação aceitável e prático para rotina de laboratório, foi realizado um estudo prévio de vários artigos de modo a compará-los e atingir os objetivos supramencionados.

Estudaram-se um conjunto de catorze artigos científicos onde foram analisadas as características mais relevantes para a seleção do método analítico, tais como o limite de detecção e de quantificação, a taxa de recuperação, as matrizes correspondentes e o método de extração, especificando se era aplicado a extração em fase sólida.

Na tabela 2.4. são apresentados os artigos que melhor se poderão adaptar à rotina do laboratório em questão, foram enumerados os catorze artigos, para facilitar a correspondência à posteriori com os parâmetros analisados, indicando os respectivos autores e o ano de publicação do artigo.

Tabela 2.5 - Enumeração dos artigos científicos estudados, evidenciando os respectivos autores e o a ano publicado (Parte 1/ 2).

Nº	Título do Artigo	Autores	Ano
1	"Simultaneous determination of acrylamide and hydroxymethylfurfural in extruded products by LC-MS/MS Method [45]"	Antun Jozinovic, Bojan Sarkanj, Durdica Ackar, Jelena Panak Balentic, Domagoj Subaric, Tanja Cvetkovic, Jasmina Ranilovic, Suncica Guberac, Jurislav Babic	2019
2	"Acetone extraction and HPLC determination of acrylamide in potato chips [46]"	F. Khoshnam, B. Zargar, N. Pourreza, H. Parham	2009
3	"Determination of acrylamide in food using a UPLC-MS/MS method: results of the official control and dietary exposure assessment in Cyprus [47]"	Demetris Kafouris, Georgios Stavroulakis, Maria Christofidou, Xenia Iakovou, Eftychia Christou, Lefkios Paikousis, Maro Christodoulidou, Eleni Ioannou-Kakouri & Stelios Yiannopoulos	2018
4	"Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass Spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting [48]"	Hamide Z. Senyuva & Vural Gökmen	2005
5	"An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry [49]"	Yu Zhang, Jingjing Jiao, Zengxuan Cai, Ying Zhang, Yiping Ren	2006
6	"Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [50]"	Olca Kaplan, Gokce Kaya, Cemile Ozcan, Muhammet Ince, Mehmet Yaman	2009
7	"Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs [51]"	Eden Tareke, Per Rydberg, Patrick Karlsson, Sune Eriksson, Margaret Tornqvist	2002
8	"Determination of Acrylamide in Portuguese Bread by UPLC-MS/MS: Metrological and Chemometric tools [52]"	Susana Jesus, Inês Delgado, Andreia Rego, Carlos Brandão, Rui Galhano dos Santos, João Bordado, Isabel Castanheira	2018
9	"Quantitation of Acrylamide in Food Samples on the TSQ Quantum Discovery by LC-APCI-MS/MS [53]"	Kevin J. McHale, Witold Winnik, Gary Paul,	2009

Tabela 2.4. - Enumeração dos artigos científicos estudados, evidenciando os respectivos autores e o ano publicado (Parte 2/ 2).

Nº	Título do Artigo	Autores	Ano
9	"Quantitation of Acrylamide in Food Samples on the TSQ Quantum Discovery by LC-APCI-MS/MS [53]"	Kevin J. McHale, Witold Winnik, Gary Paul,	2009
10	"Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [54]"	Jie Liu, Ganghua Zhao, Yuan Yuan, Fang Chen, Xiaosong Hu	2007
11	"An improved LC-MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed foods [55]"	Cheong Tae Kim, Eun-Sun Hwang, Hyong Joo Lee	2005
12	"Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products [56]"	E. Bermudo, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran	2008
13	"Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography [57]"	Vural Gokmen, Hamide Z. Senyuvab, Jale Acara, Kemal Sarioglu	2004
14	"Quantification of acrylamide in various belgian potato products using solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry detection [58]"	Caroline Douny, Joëlle Widart, Guy Maghuin-Rogister, Edwin De Pauw, Marie-Louise Scippo	2012

De seguida, considerou-se necessário mencionar as matrizes analisadas em cada artigo, bem como o método de extração que se aplicou, pois este varia consoante a complexidade e as características das matrizes em questão.

Tabela 2.6 - Matrizes analisadas nos respectivos artigos científicos estudados (1/2).

Nº	Matrizes analisadas
1	Grãos de milho, subproduto da indústria da cerveja, polpa de beterraba, resíduo de maçã e pectina
2	Batatas fritas
3	Batatas fritas, café, pão estaladiço, cereais de pequeno-almoço
4	Café torrado
5	Batatas fritas
6	Hambúrguer de vaca grelhado, hambúrguer de frango grelhado, batatas fritas, bolachas, café
7	Centeio, aveia, pão, batatas fritas
8	Pão de aveia, pão de centeio, e pão de grão integral
9	Cereais e Batatas fritas

Tabela 2.7 - Matrizes analisadas nos respectivos artigos científicos estudados (2/2).

Nº	Matrizes analisadas
10	Chá de diversos sabores
11	Arroz, pão, milho frito, batatas fritas, bolachas, doces e café
12	Batatas fritas tradicionais, palmiers, folhados, pão à base de óleo, torrões, polvorones, <i>rolled wafers</i> , churros, frutas desidratadas, azeitonas, tortilla espanhola
13	Batatas fritas (<i>crisps, chips e fries</i>)
14	Batatas fritas, batatas fritas onduladas, batatas cortadas e batatas aos cubos

Tabela 2.8 - Método de extração para cada artigo científico estudado.

Nº	Método de extração
1	Extração com metanol, e a amostra é tratada com as soluções Carrez I e Carrez II
2	Extração com hexano e posterior adição de acetona
3	Adição de água, e depois extração SPE, com cartuchos <i>Multimode</i> e <i>ENV+</i>
4	Extração com metanol, adição das soluções <i>Carrez I</i> e <i>Carrez II</i> e depois com purificação com SPE, utilização do cartucho <i>OASIS HLB</i>
5	Extração com uma solução aquosa de cloreto de sódio, e posteriormente com acetato de etilo. Depois purificação com SPE, cartucho <i>OASIS HLB</i>
6	Amostra tratada com as soluções <i>Carrez I</i> e <i>Carrez II</i> . Extração com uma solução aquosa de ácido acético (0,2mM)
7	Extração com água e depois com SPE, com cartucho <i>Isolute Multimode</i>
8	Extração com uma solução aquosa de ácido fórmico (0,1%) e depois com SPE, com cartucho <i>OASIS HLB</i>
9	Extração aquosa
10	Extração com água, acetonitrilo e sais, e posteriormente com SPE, cartucho C18
11	Extração com água e posteriormente SPE, com cartucho C18
12	Extração com água, adição das soluções <i>Carrez I</i> e <i>Carrez II</i> e, posteriormente, SPE com cartuchos <i>ENV+</i> : C18 ou C8
13	Tratamento da amostra com metanol, posteriormente com as soluções <i>Carrez I</i> e <i>II</i> , evaporação total e adição de água, e depois purificação com SPE
14	Extração com água e purificação através do SPE, com cartuchos <i>OASIS HLB</i>

Posteriormente à análise individual de cada artigo da tabela, iniciou-se a sua análise através da comparação dos limites analíticos, pois este é um parâmetro chave na validação do método. É importante ter em conta que alguns artigos não indicam limites analíticos e, por esta razão, não serão representados os respetivos valores na figura 2.10., tendo sido, para cada um dos artigos, destacado o limite de deteção e o limite de quantificação.

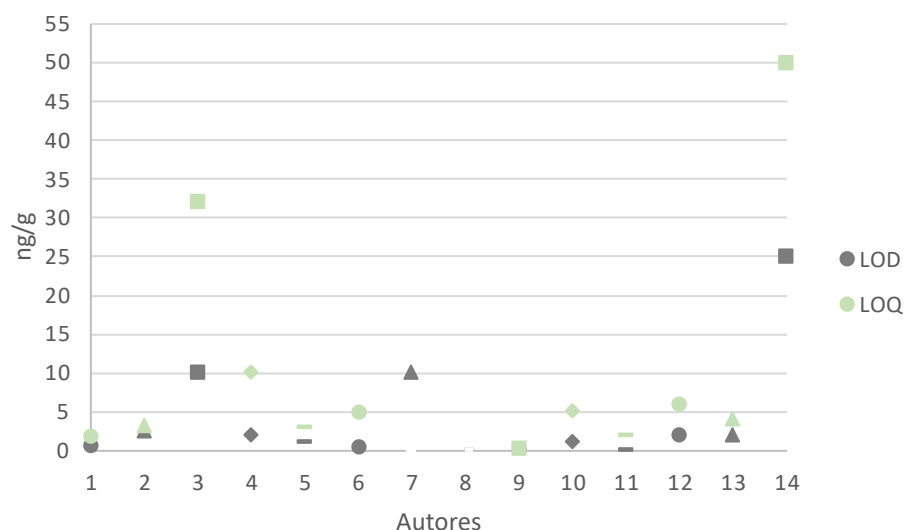


Figura 2.10 - Limite de deteção e de quantificação para cada artigo científico.

Pela figura 2.10. pode-se concluir que dos catorze artigos apenas dois deles, o terceiro e o décimo quarto, apresentam limites analíticos ligeiramente superior aos restantes porque as matrizes das amostras em questão nos respetivos artigos são mais complexas, nomeadamente batatas fritas, e são utilizadas fortificadas mais concentradas, o que aumenta conseqüentemente a gama de trabalho e os limites. O artigo 7 não apresenta limite de quantificação, o artigo 9 limite de deteção, e o artigo 8 não apresenta nenhum dos dois limites. A tabela com os valores específicos dos limites representados na figura acima, encontram-se em anexo.

De modo a relacionar cada artigo e respetiva matriz com os métodos extrativos aplicados, foi elaborado um gráfico onde os dados do gráfico da figura 2.11. cruzam com o método de extração em fase sólida (SPE), ou seja, para cada artigo é indicado os limites analíticos e se utiliza SPE ou não.

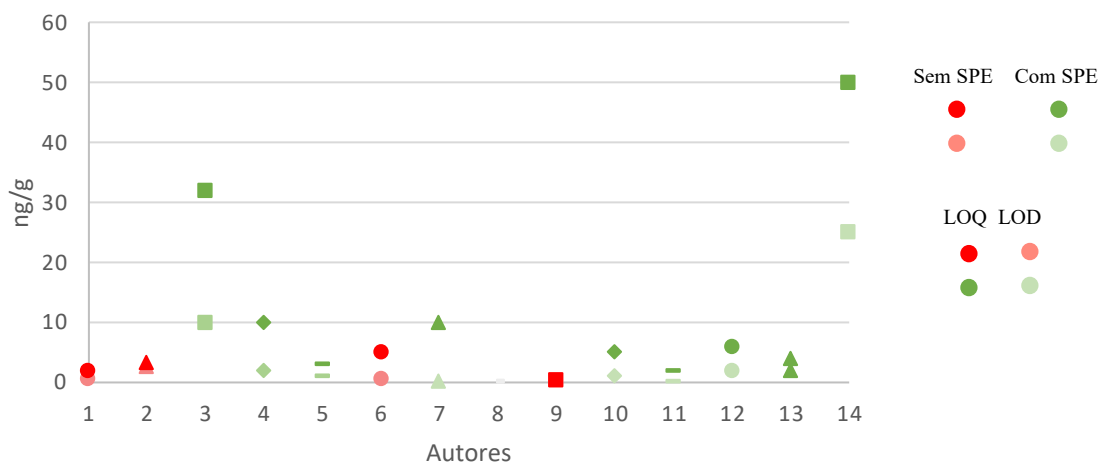


Figura 2.11 - Limites analíticos e extração em fase sólida para cada artigo científico estudado.

É possível verificar logo à primeira vista que a maioria dos artigos estudados utilizam a técnica SPE, conseguindo atingir as gamas mais elevadas para os limites analíticos e também as mais baixas, logo adequa-se muito bem a várias matrizes, enquanto os artigos que não utilizam SPE possuem limites de detecção e de quantificação baixos, e com um intervalo entre eles pequeno.

Na figura 2.12. as taxas de recuperação são comparadas dos diferentes artigos analisados, visto que é um parâmetro importante para a seleção do método adequado. Pode-se concluir através da análise do gráfico que as taxas de recuperação se encontram dentro dos limites que são considerados válidos pelo laboratório, limite inferior de 70% e limite superior de 120%, e é obtida uma média de recuperação de 94%. É de salientar que os artigos 9, 12 e 14 não apresentam taxas de recuperação, e por isso, estas não se encontram representadas graficamente. Os valores específicos das taxas de recuperação de cada artigo encontram-se na tabela em anexo.

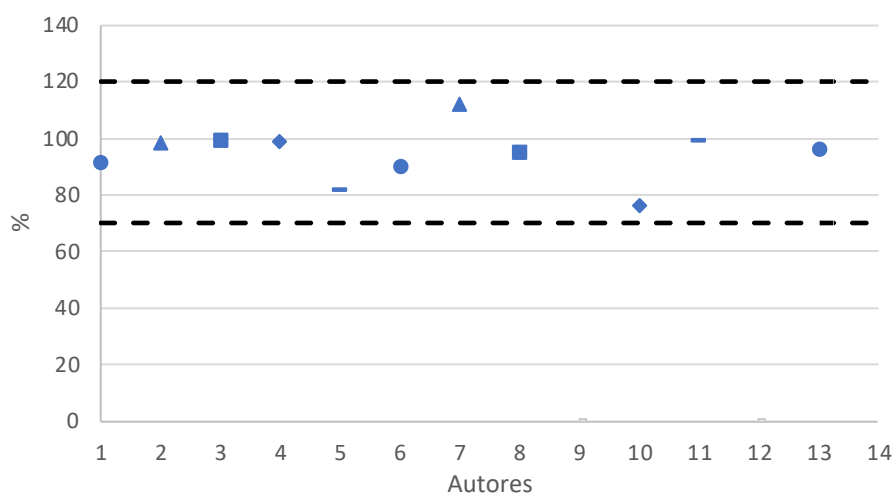


Figura 2.12 - Taxa de recuperação para cada artigo científico.

É possível relacionar também as taxas de recuperação com a extração em fase sólida, sendo as marcas verdes correspondentes à utilização da técnica SPE e as a vermelho os artigos que não aplicam este método extrativo. Dos três artigos que não utilizam SPE é obtida uma média da taxa de recuperação de 93% e dos oito artigos com SPE a média é de 95%, aproximadamente. Verifica-se que as marcas a verde atingem valores de recuperação mais elevados, e também os mais baixos, e possuem uma média de recuperação superior à média dos catorze artigos analisados.

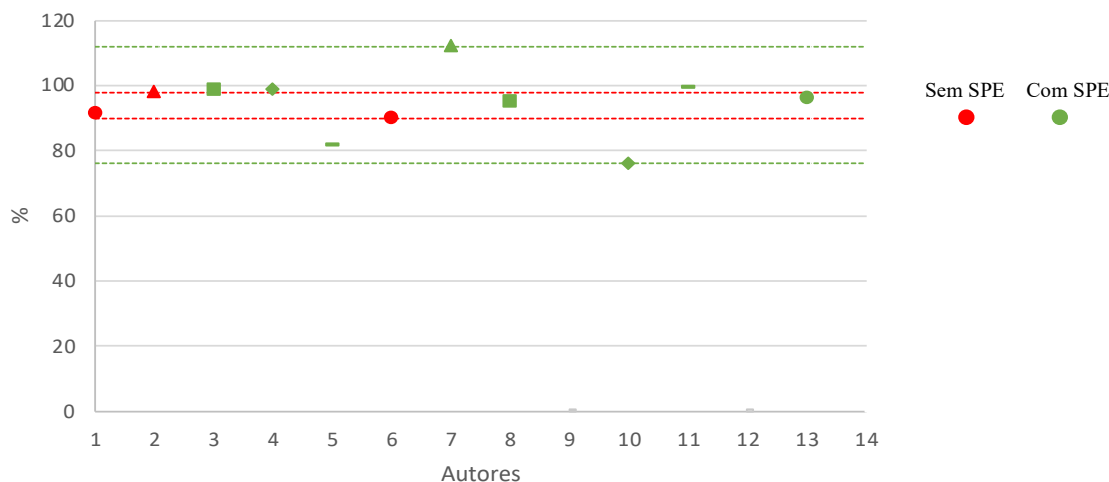


Figura 2.13 - Taxa de recuperação e extração em fase sólida para cada artigo científicos estudado.

Em suma, todos os artigos pré-selecionados apresentam taxas de recuperação aceitáveis e limite analíticos semelhantes, por tanto, a eleição do procedimento experimental final baseou-se na aplicação do mesmo na rotina de laboratório tendo em conta os custos associados tal como o tempo de preparação da amostra, e os resultados cromatográficos obtidos.

De modo a otimizar o procedimento experimental e adequá-lo às condições laboratoriais, foram analisadas em primeiro algumas amostras de acordo com a especificação técnica de serviço em vigor, que está esquematizada na figura 2.14.

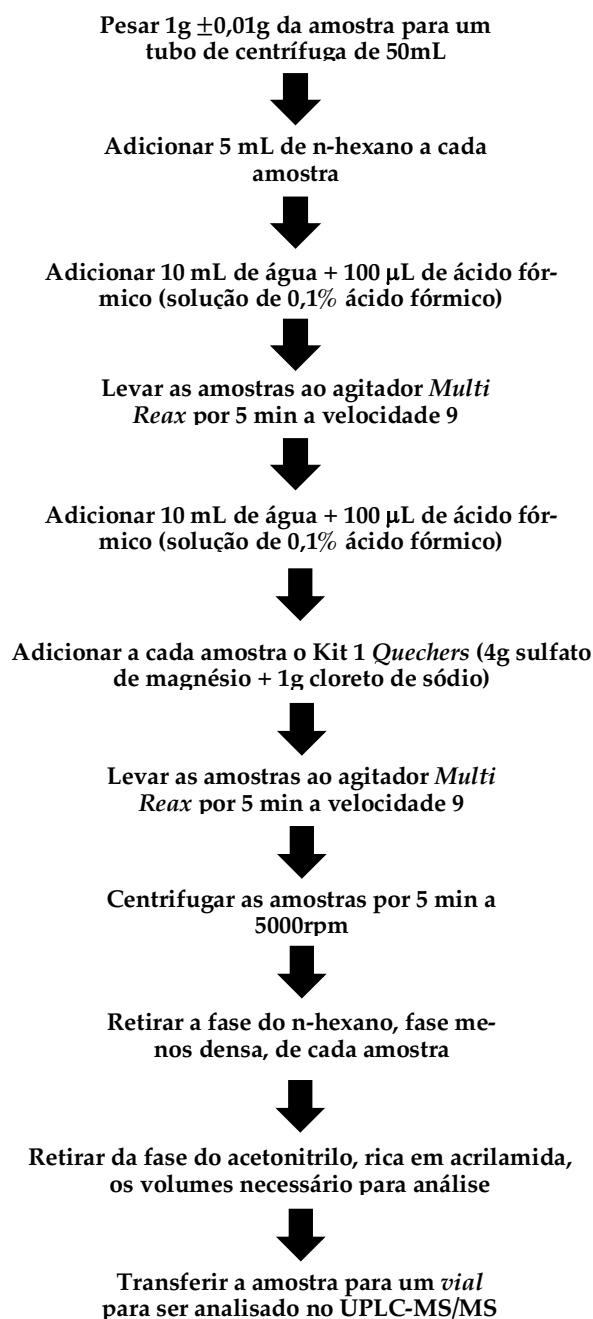


Figura 2.14 - Procedimento experimental em vigor no laboratório antes do estudo (Parte 1/2).

Com os resultados cromatográficos obtidos foi possível verificar que o método de extração com acetonitrilo não é muito eficaz, não sendo detetado o pico cromatográfico da acrilamida pela análise por UPLC-MS/MS, e como tal foram testados alguns dos artigos apresentados anteriormente para eleger o mais apropriado. Os artigos 6, "*Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry*", e 8, "*Determination of Acrylamide in Portuguese Bread by UPLC-MS/MS: Metrological and Chemometric tools*", foram os artigos onde se obteve melhores resultados nas condições do laboratório e podem ser adaptados com facilidade, sendo, por tanto, os procedimentos experimentais adaptados, e estão ilustrados nas seguintes figuras.

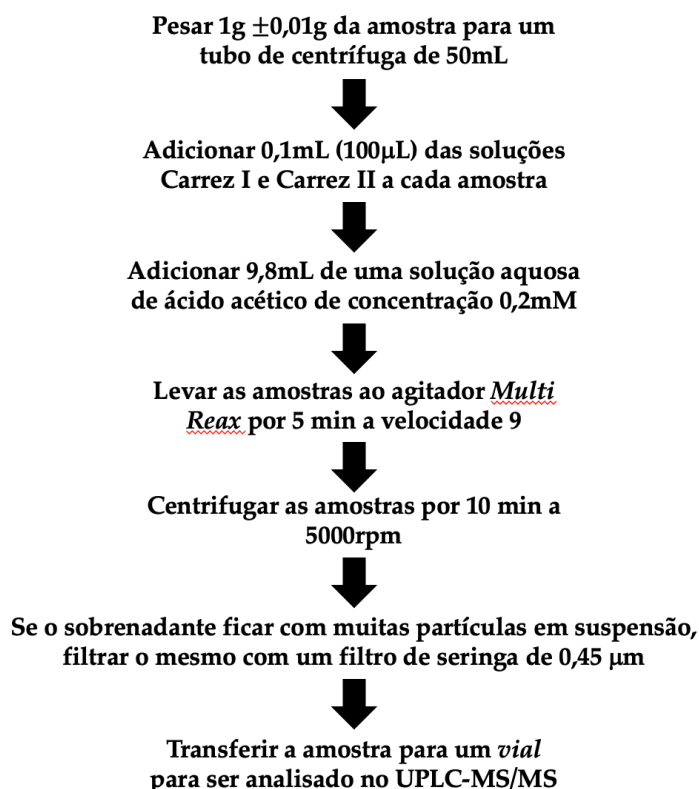


Figura 2.15 - Procedimento Experimental com extração por Carrez.

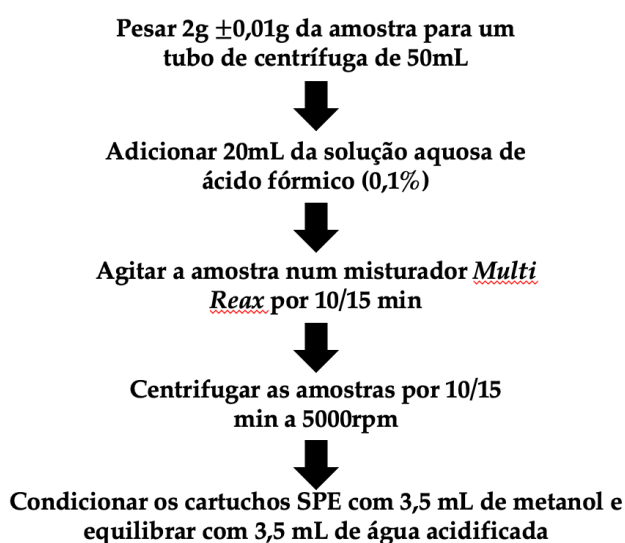


Figura 2.16 - Procedimento experimental com extração por SPE. (1/2)

Carregar com 1,5 mL da amostra e eluir com 3mL de água acidificada para um balão de 10 mL, tendo o volume sido perfazido com a água acidificada



Se o sobrenadante ficar com muitas partículas em suspensão, filtrar o mesmo com um filtro de seringa de 0,45 µm



Transferir a amostra para um *vial* para ser analisado no UPLC-MS/MS

Figura 2.17 - Procedimento experimental com extração por SPE. (2/2)

Foram eleitos dois procedimentos experimentais, visto que a análise de certas matrizes mais complexas, como as batatas fritas, com a extração pelas soluções Carrez não eram eficazes, e sendo a técnica SPE, uma técnica bastante aplicada a este tipo de amostras, será efetuada uma validação para os dois procedimentos.

O procedimento experimental com a utilização das soluções Carrez foi adaptado do artigo 6, alterando o *vortex* para um agitador *Multi Reax* e a centrifugação é efetuada à temperatura ambiente, conseguindo obter bons resultados. O segundo procedimento experimental, que utiliza a extração em fase sólida, foi baseado no artigo 8 compilando a parte da agitação, no *vortex* e no agitador oscilante durante 30 minutos, em 10 min num agitador *Multi Reax*. Em ambas as metodologias, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (UPLC-MS/MS).

Neste capítulo vão ser abordados os materiais utilizados durante todo o processo bem como a parte explicativa de todo o método.

3.1. Materiais

3.1.1. Preparação da amostra

No desenvolvimento e realização da etapa de preparação da amostra os materiais e equipamentos utilizados foram: material de vidro corrente num laboratório de química, como por exemplo balões volumétricos, funis, pipetas, copos, etc; moinhos trituradores, da marca *Retsch* e modelos GM 200 e GM 300; tubos *falcon* de plástico de 50mL; balança analítica da marca VRW, com precisão de 0,1mg; micropipetas da marca *Eppendorf*, calibradas externamente, com capacidades 1:10 μ L, 10:100 μ L e 100:1000 μ L; agitador de tubos, com movimento de agitação de vibração da marca *MultiReax*; centrífuga de mesa da marca *Hettich* e do modelo Universal 320; *manifold* da extração em fase sólida da marca *Waters*; bomba de vácuo da marca VWR; cartuchos para a extração em fase sólida da marca *Waters* e modelo Oasis HLB; seringas descartáveis; filtros com membrana de polipropileno com poros de dimensão de 0,45 μ m da marca VWR.



Figura 3.1 - Moinho triturador GM 300.



Figura 3.2 - Balança analítica.



Figura 3.3 - Moinho triturador GM 200.



Figura 3.6 - Micropipeta 1000 µL



Figura 3.5 - Micropipeta 100 µL.



Figura 3.4 - Micropipetas 10 µL.



Figura 3.7 - Seringas descartáveis.



Figura 3.8 - Filtros 0,45 µm.



Figura 3.10 - Cartuchos de extração em fase sólida

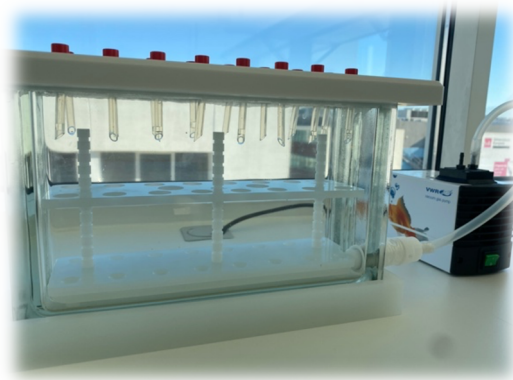


Figura 3.9 - Manifold e bomba SPE.



Figura 3.11 - Centrífuga de mesa.

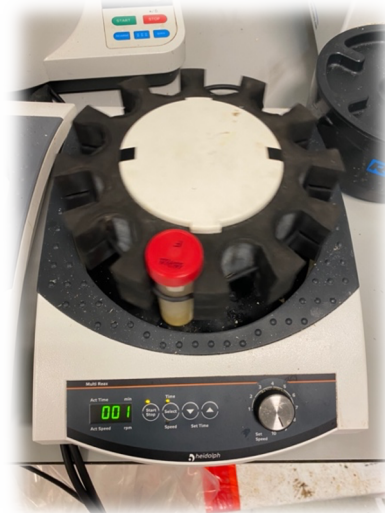


Figura 3.12 - Agitador *MultiReax*.

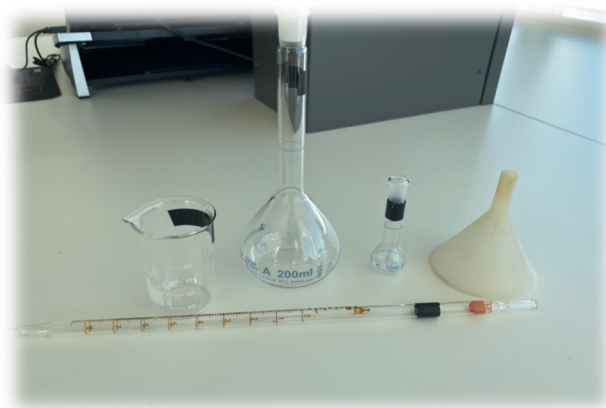


Figura 3.13 - Material de vidro de laboratório.

3.1.2. Análise da amostra

Para a análise e quantificação da amostra é necessário transferir a mesma para um *vial* de modo a ser analisado no equipamento de UHPL a uma pressão de 1300 bar, composto por *Elute* UHPLC (LC-MS), bomba HPG 1300, Elute Autosampler, coluna cromatográfica Hypercarb da marca *Thermo Fisher Scientific* e um equipamento de MS/MS de triplo quadrupolo do modelo EVOQ Qube, tanto este equipamento como o de cromatografia líquida de ultra eficiência são da marca *Bruker*.



Figura 3.15 - UHPLC-MS/MS



Figura 3.14 - Coluna cromatográfica *Hypercarb*



Figura 3.17 - Vials



Figura 3.16 - Tampas dos vials

3.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados durante todo o procedimento experimental foram metanol (CH_3OH) da marca Honeywell Riedel-de Haën, com uma pureza superior a 99,9%, apropriado para LC-MS, ácido fórmico (HCOOH) da marca Carlo Erba, com uma pureza superior a 98%, para LC-MS, água ultrapura da marca VWR filtrada a $2\mu\text{m}$, para HPLC, água ultrapura do tipo 1 da MilliQ, ácido acético glacial 99,8-100,5% ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) da marca VWR, solução padrão de acrilamida de concentração 1000mg/mL da marca *Dr. Ehrenstorfer*, sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) da marca VWR, com pureza superior a 99,5%, e ferricianeto de potássio.



Figura 3.23 - Padrão acrilamida



Figura 3.21 - Metanol para LC-MS

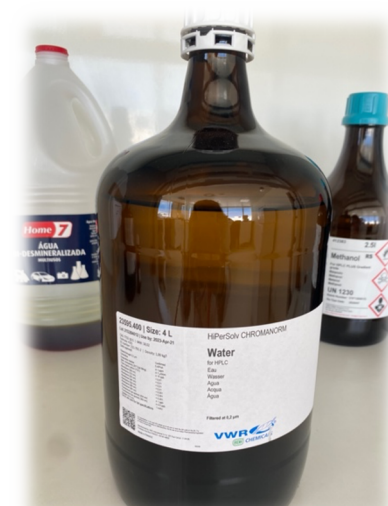


Figura 3.22 - Água ultrapura para HPLC

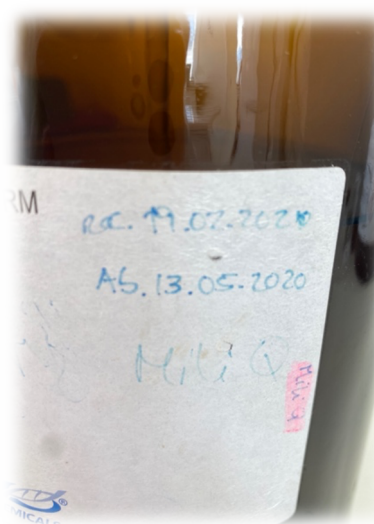


Figura 3.18 - Água Milli-Q



Figura 3.19 - Ácido Fórmico para LC-MS



Figura 3.20 - Ácido acético glacial

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação da fase móvel

Para a preparação da fase móvel A diluiu-se 1 mL de ácido fórmico em água ultrapura, ambos para LC-MS, até perfazer um balão volumétrico de 1000 mL.

Para a preparação da fase móvel B adicionou-se 1 mL de ácido fórmico a metanol, para LC-MS, num balão volumétrico de 1000 mL.



Figura 3.24 - Fase Móvel A e Fase Móvel B

3.2.2. Preparação das soluções de extração

Para a realização da extração convencional é necessária a preparação de uma solução de ácido acético de 0,2mM, que se baseia na diluição de 2mL de ácido acético glacial, num balão volumétrico de 200mL, em água da MilliQ, e na preparação das soluções Carrez I, diluir 15g de ferricianeto de potássio em 100 mL de água MilliQ, e Carrez II, diluir 30g de sulfato de zinco em 100 mL de água MilliQ.

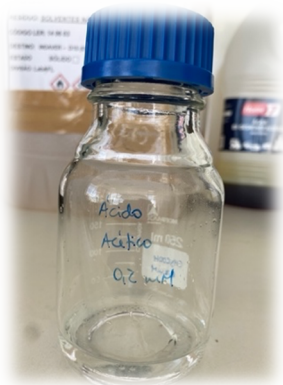


Figura 3.25 - Solução aquosa de ácido acético (0,2mM)

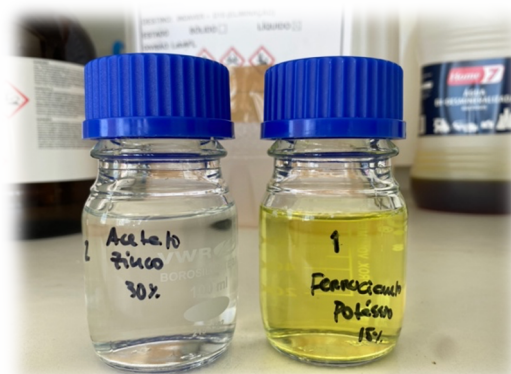


Figura 3.26 - Soluções Carrez I (amarela) e Carrez II (incolor)

Na extração em fase sólida é preparada uma solução aquosa de ácido fórmico (0,1%) onde foi pipetado 100 μ L de ácido fórmico para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi perfeito com água MilliQ.



Figura 3.27 - Solução aquosa de ácido fórmico (0,1%)

3.2.3. Preparação das soluções padrão

Inicialmente, foi preparada uma solução mãe de acrilamida, com uma concentração de 1000 ppm, onde é pesada 0,01g do padrão de acrilamida e dissolvido em 20 mL de água MilliQ, posteriormente deve ser armazenada a 4°C. É a partir desta solução mãe de acrilamida que são preparadas as três soluções padrão de trabalho.



Figura 3.28 - Solução mãe de acrilamida (1000 ppm)

A solução de trabalho 1, tem uma concentração de 10 ppm, e é preparada pipetando 990 μL de água para um *vial* de 2 mL e com a adição de 10 μL da solução mãe de acrilamida (1000 ppm).

A solução de trabalho 2, de concentração 1 ppm, é preparada com a diluição de 100 mL da solução de trabalho 1 (10 ppm) em 990 mL de água, num vial de 2 mL.

A solução de trabalho 3, com uma concentração de 0,1 ppm, é preparada num vial de 2 mL onde se adiciona 100 mL da solução de trabalho 2 (1 ppm) a 990 μL de água.

Para todas as soluções, à priori da sua preparação, devem ser agitadas vigorosamente de modo a homogeneizá-las e podem ser dimensionadas de acordo com o volume necessário

de cada uma. Cada solução de trabalho deve ser preparada sempre que se efetuar o método de ensaio.

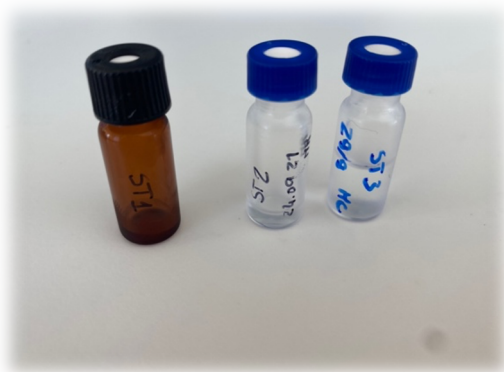


Figura 3.29 - Soluções de trabalho (10, 1 e 0,1 ppm)

3.2.4. Curvas de Calibração em extrato

Para a preparação das curvas de calibração utilizando o extrato com a matriz foram utilizadas as soluções de trabalho 2, 1 ppm, e 3, 0,1 ppm, de modo a alcançar um intervalo maior de concentrações.

Diariamente, por cada ensaio de matriz diferente, eram efetuados dois padrões de controlo, PC1 e PC2, que correspondiam aos níveis mais baixos e mais altos da curva de calibração.

Os pontos correspondentes a cada nível de concentração das curvas de calibração, para as matrizes cereais/bolachas, pão e batatas fritas, bem como os volumes utilizados de cada solução de trabalho estão representados na tabela seguinte.

Tabela 3.1 - Curvas de calibração em extrato.

Ponto da curva de calibração	Concentração (ng/mL)	Volume da solução de trabalho (μL)	Volume do extrato (μL)	Volume final (μL)
1 – PC1	2	20 Sol. Trabalho 3	980	1000
2	10	100 Sol. Trabalho 3	900	1000
3	25	50 Sol. Trabalho 2	975	1000
4	50	65 Sol. Trabalho 2	950	1000
5	75	75 Sol. Trabalho 2	925	1000
6 – PC2	100	100 Sol. Trabalho 2	900	1000

3.2.5. Curva de Calibração em solvente

Para as curvas de calibração em solvente foram utilizadas as mesmas soluções de trabalho, 2 e 3, de modo a construir uma curva de calibração com as mesmas concentrações que as em extrato, de modo a compará-las entre si.

Para o procedimento experimental com a extração SPE o solvente utilizado na reta foi a solução aquosa de ácido fórmico e com a extração convencional foi utilizada a solução aquosa de ácido acético como solvente. Para ambas as curvas os pontos avaliados são os mesmos, sendo representados os pontos destas na tabela 3.2. que se segue.

Tabela 3.2 - Curvas de calibração em solvente aquoso de ácido fórmico (extração SPE) e de ácido acético (extração convencional).

Ponto da curva de calibração	Concentração (ng/mL)	Volume da solução de trabalho (μ L)	Volume do solvente(μ L)	Volume final (μ L)
1 – PC1	2	20 Sol. Trabalho 3	980	1000
2	10	100 Sol. Trabalho 3	900	1000
3	25	50 Sol. Trabalho 2	975	1000
4	50	65 Sol. Trabalho 2	950	1000
5	75	75 Sol. Trabalho 2	925	1000
6 – PC2	100	100 Sol. Trabalho 2	900	1000

3.2.6. Preparação das amostras fortificadas

Para a preparação das amostras fortificadas é pipetada a quantia correspondente da solução de trabalho 2 consoante o nível de fortificação desejado antes do processo da extração, e após a adição do volume da solução as amostras devem ser agitadas no agitador *MultiReax* durante 1 minuto de modo a homogeneizar e fortificar a matriz corretamente.

O nível mais baixo de fortificação corresponde ao limite de quantificação (LOQ) regulamentado pela comissão europeia para a análise de acrilamida [18], e o segundo nível de fortificação corresponde à concentração máxima das curvas de calibração.

Tabela 3.3 - Níveis das fortificadas nas matrizes analisadas.

Fortificadas	Matriz	Concentração (μ g/Kg)	Volume da solução de trabalho 2 (μ L)
1	Cereais/Bolachas, pão e batatas fritas	20	20
2	Cereais/Bolachas, pão e batatas fritas	100	100

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Ao longo do capítulo 4 vão ser demonstrados e discutidos os resultados obtidos para a validação do método de quantificação mais adequado para cada tipo de matriz, bolachas/cereais, batatas fritas e pão, de acordo com os parâmetros de validação apresentados no capítulo 2.

4.1. Validação da matriz bolachas/cereais

O método para a quantificação de acrilamida nas matrizes bolachas/cereais foi validado para a extração em fase sólida e para a extração convencional por solventes, visto que ao longo dos testes sentiu-se a necessidade de avaliar algumas amostras pela extração em fase sólida devido à existência de resultados duvidosos.

4.1.1. Especificidade / Seletividade

Para verificar se a extração em fase sólida é específica e seletiva nas matrizes bolachas/cereais, foram efetuados cinco ensaios independentes de amostras fortificadas ao nível do limite de quantificação estipulado pela comissão europeia, 20 µg/kg. A quantificação do pico cromatográfico foi efetuada pela curva de calibração da matriz em questão, e a taxa de recuperação foi calculada através da equação 2.1. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 4.1.

Na extração convencional, com a utilização das soluções Carrez I e II, foram fortificadas amostras de bolachas/cereais a dois níveis distintos, a 20 µg/kg e 40 µg/kg, visto que será o método de extração mais aplicado a amostras deste tipo de matriz é necessário avaliar este parâmetro a mais que um nível de concentração, dentro da gama de trabalho. Os ensaios foram efetuados de modo independente, e os respetivos resultados encontram-se na tabela 4.2 subdivididos nos dois níveis de fortificação, 1º e 2º.

Para todas as amostras de bolachas e cereais obteve-se taxas de recuperação dentro dos limites estabelecidos pelo laboratório.

Tabela 4.1 - Taxas de recuperação para extração em fase sólida em matrizes cereais/ bolachas.

Nível de Fortificação	[Analito adicionado] (µg/kg)	[Amostra] (µg/kg)	[Fortificada] (µg/kg)	[Fortificada]-[Amostra]	Taxa de Recuperação (%)
1º	20	51,10	82,53	31,44	157,18%
		2,65	29,31	26,65	133,26%
		3,40	27,06	23,65	118,26%
		37,86	58,50	20,64	103,19%
		3,12	22,61	19,49	97,47%

Tabela 4.2 - Taxas de recuperação para extração com solventes em matrizes cereais/ bolachas.

Nível de Fortificação	[Analito adicionado] (µg/kg)	[Amostra] (µg/kg)	[Fortificada] (µg/kg)	[Fortificada]-[Amostra]	Taxa de Recuperação (%)
1°	20	45,64	73,21	27,57	137,85%
		0,78	17,80	17,01	85,07%
		0,31	23,60	23,29	116,45%
		4,73	22,00	17,27	86,37%
		18,66	32,78	14,12	70,58%
2°	40	14,99	53,04	38,05	95,13%
		0,63	40,88	40,25	100,62%
		22,26	61,84	39,58	98,96%
		10,34	49,60	39,26	98,15%
		61,84	98,61	36,77	91,92%

Foi estimada a média, o desvio padrão e o coeficiente médio de variação para a extração em fase sólida, ao nível de 20 µg/kg, e para a extração convencional com a utilização das soluções Carrez I e II, ao nível de 20 µg/kg e 40 µg/kg.

Os coeficientes de variação média aplicados às taxas de recuperação estão dentro dos resultados esperados, CVm inferior a 10%, o que significa que não existe muita variância entre os resultados de cada nível de fortificação, no método extrativo associado.

Foi a extração em fase sólida que obteve uma média maior das taxas de recuperação, porque é um método que apenas é aplicado a amostras positivas e, teoricamente, uma das vantagens do método SPE em si é otimizar as taxas de recuperação. A média das taxas de recuperação para a extração com a utilização das soluções Carrez I e II era a esperada, e apresentou maioritariamente resultados satisfatórios aos dois níveis das amostras fortificadas.

Tabela 4.3 - Média, Desvio padrão e coeficiente de variação média para as taxas de recuperação da matriz cereais/bolachas.

	Média	Desvio Padrão	CVm (%)
Extração SPE (Fortificada a 20 µg/kg)	109,65%	0,108	9,85%
Extração com solventes (Fortificada a 20 µg/kg)	103,27%	0,101	9,79%
Extração com solventes (Fortificada a 40 µg/kg)	94,26%	0,078	8,26%

a4.1.2. Gama de trabalho e Linearidade

A realização das curvas de calibração para cada tipo método extrativo permite avaliar a dependência da resposta do aparelho de cromatografia em função de concentrações conhecidas, é de notar que o intervalo destas concentrações devem abranger a quantidade de acrilamida esperada para os alimentos em questão.

A curva de calibração para cada tipo de amostra deve conter no mínimo 5 pontos de concentrações conhecidas e distribuídas uniformemente ao longo da gama analisada. A avaliação da linearidade da curva é efetuada através da representação gráfica da mesma e do coeficiente de correlação, que como o próprio nome indica relaciona o sinal medido pelo aparelho de medição e a concentração do padrão correspondente mostrando a interdependência dos dados obtidos, o valor do coeficiente tem que ser superior a 0,995 para ser válido.

A reta de calibração para a matriz bolachas/cereais com a extração em fase sólida associada foi construída através de seis pontos de referência, e está representada na figura 4.1, e os respetivos valores de concentrações e de área do pico encontram-se na tabela 4.4.

A reta de calibração para a matriz bolachas/cereais utilizando a extração convencional por solventes foi, também, contruída por seis pontos distintos e está representada graficamente na figura 4.2 com os resultados apresentados na tabela 4.5.

Tabela 4.4 - Concentrações dos pontos da curva de calibração com as respetivas áreas dos picos cromatográficos para a matriz cereais/bolachas, por extração em fase sólida.

Pontos da Curva de Calibração	Concentração (ng/mL)	Área do pico ⁽¹⁾
1	2	3642
2	10	35228
3	25	96490
4	50	235954
5	75	326324
6	100	443735

(1) A área do pico corresponde à área mensurada pelo aparelho descontando o valor da área da amostra, de modo a retirar a quantidade de acrilamida naturalmente presente na matriz.

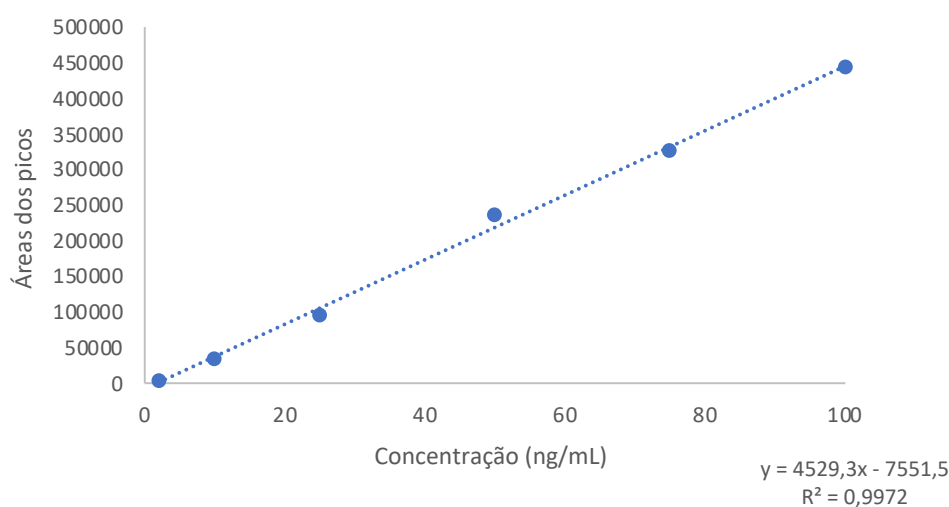


Figura 4.1- Curva de calibração para a matriz cereais/ bolachas com a respetiva linha de tendência, por extração em fase sólida.

Tabela 4.5 - Concentrações dos pontos da curva de calibração com as respectivas áreas dos picos cromatográficos para a matriz cereais/bolachas, por extração convencional de solventes.

Pontos da Curva de Calibração	Concentração (ng/mL)	Área do pico ⁽¹⁾
1	2	4622
2	10	18034
3	25	41501
4	50	74854
5	75	114808
6	100	152443

(1) A área do pico corresponde à área mensurada pelo aparelho descontando o valor da área da amostra, de modo a retirar a quantidade de acrilamida naturalmente presente na matriz.

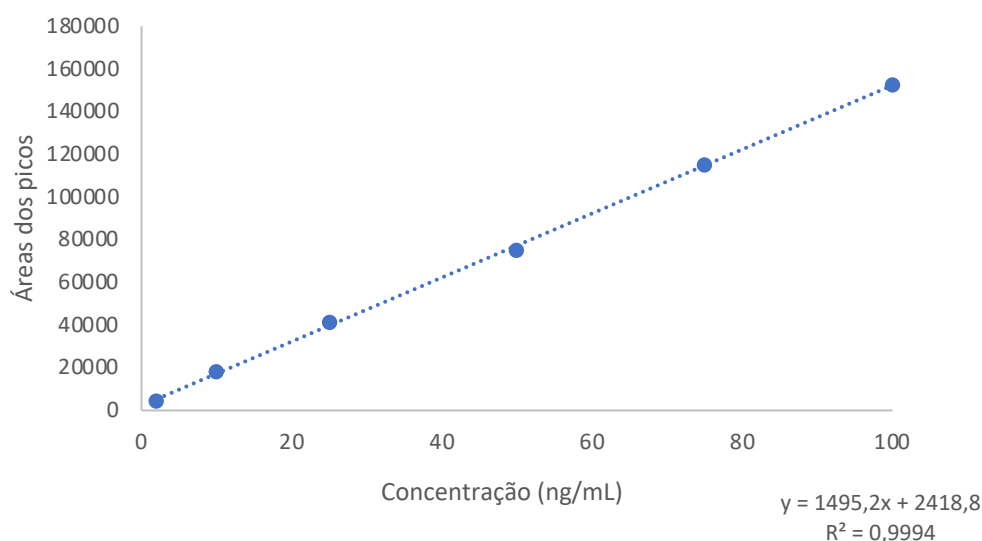


Figura 4.2 - Curva de calibração para a matriz cereais/ bolachas com a respectiva linha de tendência, por extração convencional de solventes.

Para ambas as extrações aplicadas a esta matriz, consegue-se concluir através das representações gráficas das curvas que estas apresentam uma linha de tendência linear. Para a extração em fase sólida é obtido um coeficiente de determinação, r^2 , de 0,9972 e para a extração convencional por solventes, com as soluções *Carrez* I e II, obteve-se um r^2 de 0,9994, concluindo assim que ambos os modelos lineares são aplicáveis aos resultados experimentais apresentando uma variabilidade reduzida dos mesmos.

De modo a verificar a veracidade da linearidade analisada anteriormente foi aplicado o método dos mínimos quadrados às curvas, visto que é o método que melhor se ajusta aos pontos experimentais obtidos e não fornece resultados tendenciosos, reduzindo a variância associada.

Através deste método obtêm-se os parâmetros da linha de tendência de cada curva, e consequentemente é possível calcular o coeficiente de variação média de cada uma e verificar se este é inferior a 10%, e concluir que as curvas são lineares.

Tabela 4.6 - Linearidade respetiva à curva de calibração com a extração convencional por solventes para a matriz cereais/bolachas.

Declive (b)	1495,23
Ordenada na origem (a)	2418,84
Coefficiente de correlação (R)	0,99971
Coefficiente de determinação (R²)	0,99942
Sensibilidade (e)	1495,23
Desvio padrão residual da reta (Sy/x)	1555,47
Desvio padrão do declive (Sb)	18,07
Desvio padrão da ordenada na origem (Sa)	826,87
Desvio padrão do método (Sm)	1,04
Coefficiente de Variação do método (%)	2,38%
Crítério de Aceitação (%)	SIM

Tabela 4.7 - Linearidade respetiva à curva de calibração com a extração em fase sólida para a matriz cereais/bolachas.

Declive (b)	4529,32
Ordenada na origem (a)	-7551,48
Coefficiente de correlação (R)	0,99861
Coefficiente de determinação (R²)	0,99723
Sensibilidade (e)	4529,32
Desvio padrão residual da reta (Sy/x)	10275,28
Desvio padrão do declive (Sb)	119,34
Desvio padrão da ordenada na origem (Sa)	5462,20
Desvio padrão do método (Sm)	2,27
Coefficiente de Variação do método (%)	5,20%
Crítério de Aceitação (%)	SIM

Os resultados obtidos pelo método dos mínimos quadrados encontram-se nas tabelas 4.6 e 4.7, onde se verifica que o coeficiente de variação do método de extração em fase sólida é de 2,38% e o do método de extração convencional por solventes é de 5,20%, ambos inferiores ao limite máximo estabelecido teoricamente para validar a linearidade das curvas.

Considerou-se importante avaliar a análise dos resíduos das curvas de calibração, visto que estas se aplicam ao modelo de regressão linear que assume uma variável independente sem erros associados, concentração do analito, e uma variável dependente, a resposta do aparelho de cromatografia. O método pode-se dizer homoscedástico se os resíduos calculados independentemente possuírem igual variância e estiverem uniformemente distribuídos.

O resíduo amostral foi calculado para todos os pontos da curva de calibração em ambos os métodos demonstrados para a matriz bolachas/cereais, como se pode verificar graficamente e quantitativamente pelas tabelas e figuras que se seguem. Tanto para a extração em fase sólida como para a extração convencional verificou-se que à concentração de 2 ng/mL, o resíduo não se enquadra nos parâmetros exigidos, visto que é a concentração mais baixa a quantificação de acrilamida a este nível é sempre mais complicada, no entanto não tem grande implicância na implementação do método visto que não são reportadas quantidades inferiores a 20 ng/mL.

Tabela 4.8 - Determinação da gama de linearidade através da análise dos resíduos para a matriz cereais/bolachas, por extração em fase sólida.

Concentração (ng/mL)	Área do Pico	Área do pico estimada	Resíduo	Critério de Aceitação (<10%)
2	3642	1507,162545	-141,65%	NO
10	35228	37741,72334	6,66%	YES
25	96490	105681,5248	8,70%	YES
50	235954	218914,5273	-7,78%	YES
75	326324	332147,5298	1,75%	YES
100	443735	445380,5322	0,37%	YES

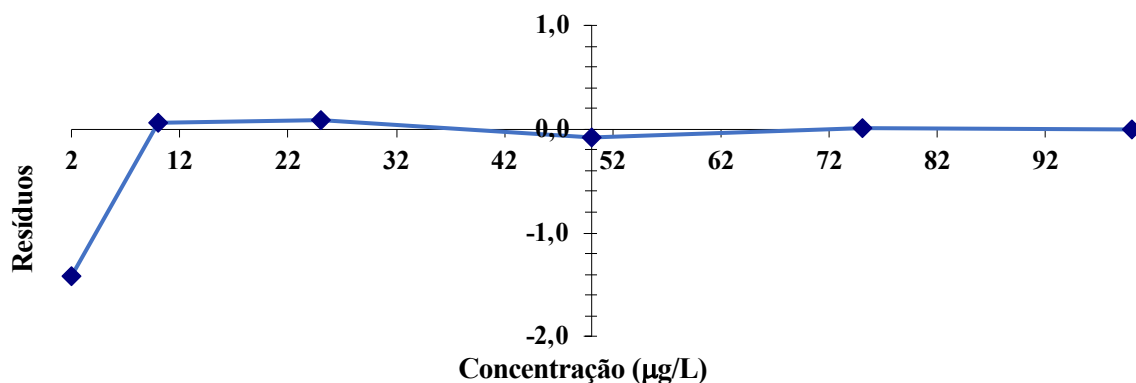


Figura 4.3 - Gráfico da análise de resíduos referente à matriz cereais/bolachas, por extração em fase sólida.

Tabela 4.9 - Determinação da gama de linearidade através da análise dos resíduos para a matriz cereais/bolachas, por extração convencional de solventes.

Concentração (ng/mL)	Área do Pico	Área do pico estimada	Resíduo	Critério de Aceitação (<10%)
2	4622	5409,289793	14,55%	NO
10	18034	17371,09015	-3,82%	YES
25	41501	39799,46583	-4,28%	YES
50	74854	77180,09195	3,01%	YES
75	114808	114560,7181	-0,22%	YES
100	152443	151941,3442	-0,33%	YES

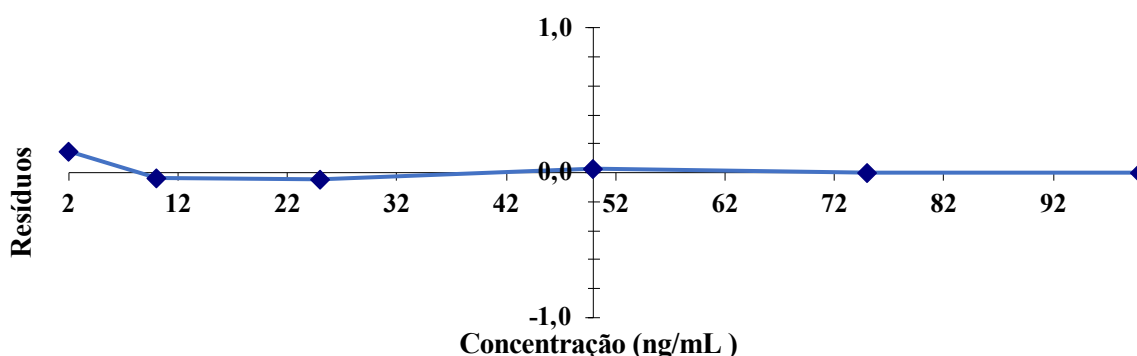


Figura 4.4 - Gráfico da análise de resíduos referente à matriz cereais/bolachas, por extração convencional de solventes.

4.1.3. Repetibilidade

Para a análise da repetibilidade da matriz cereais/bolachas foram efetuados 10 ensaios independentes ao nível mais baixo, 2 ng/mL, e mais alto, 100 ng/mL, da gama da curva de calibração, de modo a verificar a dispersão entre os resultados obtidos para cada tipo de método de extração.

O teste da homogeneidade de variâncias foi aplicado para a determinação da gama de trabalho. No geral, para todos os métodos quantitativos existe um intervalo de concentrações para o analito para que o método possa ser aplicado. Assim, a gama de trabalho representa a gama de concentrações na qual a sensibilidade é considerada constante e são normalmente expressas nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

Em suma, para cada tipo método extrativo foi elaborada uma análise sobre o limite de repetibilidade, o coeficiente de variação médio para cada nível de concentração, e a homogeneidade das variâncias dos resultados obtidos, representados nas tabelas seguintes.

Tabela 4.10 - Repetibilidade ao nível do PC1 e do PC2 da curva de calibração, com o respetivo coeficiente de variação para as matrizes cereais/ bolachas, com extração por solventes.

2 ng/mL (PC1)			100 ng/mL (PC2)		
Área do Pico	Tempo de Retenção	Razão Iónica	Área do Pico	Tempo de Retenção	Razão Iónica
5560	1,626	4,80%	158833	1,61	3,60%
5124	1,613	5,10%	159139	1,606	3,90%
4768	1,611	5,00%	163236	1,603	3,80%
5315	1,606	4,80%	159356	1,598	3,80%
5625	1,609	4,90%	160608	1,592	3,50%
5234	1,615	4,40%	159325	1,586	3,80%
5147	1,612	5,40%	159894	1,586	4,00%
5385	1,593	5,20%	163772	1,581	3,60%
4895	1,612	5,40%	160311	1,577	4,00%
4607	1,604	5,60%	160844	1,586	3,60%

Média	5166	1,6101	5,06%	160531,8	1,5925	3,76%
Variância	109683,78	7,12E-05	1,27E-05	2892788,40	1,25E-04	3,16E-06
Desvio Padrão	331,19	8,44E-03	3,57E-03	1700,82	1,12E-02	1,78E-03
Limite de repetibilidade (r)	927,32	2,36E-02	9,98E-03	4762,30	3,14E-02	4,97E-03
CVr (%)	6,41%	0,52%	7,05%	1,06%	0,70%	4,72%
Critério de Aceitação	YES	YES	YES	YES	YES	YES

Tabela 4.11 - Homogeneidade de variâncias para a determinação da gama de trabalho, relativamente aos resultados de repetibilidade com a extração convencional por solventes em matriz cereais/ bolachas.

	2 ng/mL	100 ng/mL
n	10	10
n-1	9	9
Média (yn)	5166	160531,8
Desvio padrão (yn)	331,19	1700,82
Desvio padrão relativo (yn)	6,41%	1,06%
Variância (Sn)	1,10E+05	2,89E+06
PG		5,14
F_(n1-1, n10-1, 99,0 %) =		5,35
Critério de Aceitação: SIM		

Tabela 4.12 - Repetibilidade ao nível do PC1 e do PC2 da curva de calibração, com o respetivo coeficiente de variação para as matrizes cereais/ bolachas, com extração por solventes.

2 ng/mL (PC1)			100 ng/mL (PC2)		
Área do Pico	Tempo de Retenção	Razão Iónica	Área do Pico	Tempo de Retenção	Razão Iónica
28824	0,956	4,00%	792396	0,954	4,50%
38773	0,953	4,00%	866428	0,952	4,20%
36189	0,953	5,00%	829508	0,95	4,80%
39752	0,955	4,00%	790017	0,947	4,00%
37817	0,95	4,30%	777794	0,953	4,50%
35951	0,953	5,40%	744128	0,95	4,10%
35190	0,968	4,40%	790619	0,945	4,40%
30449	0,957	3,90%	769979	0,957	4,10%
33359	0,956	3,90%	827069	0,949	4,20%
33928	0,949	5,60%	810524	0,956	4,70%

Média	35023,2	0,955	4,45%	799846,2	0,9513	4,35%
Variância	1,22E+07	2,76E-05	4,18E-05	1,21E+09	1,47E-05	7,39E-06
Desvio Padrão	3492,82	5,25E-03	6,47E-03	34782,15	3,83E-03	2,72E-03
Limite de repetibilidade (r)	9779,89	1,47E-02	1,81E-02	97390,02	1,07E-02	7,61E-03
CVr (%)	9,97%	0,55%	14,53%	4,35%	0,40%	6,25%
Critério de Aceitação	YES	YES	NO	YES	YES	YES

Tabela 4.13 - Homogeneidade de variâncias para a determinação da gama de trabalho, relativamente aos resultados de repetibilidade com a extração em fase sólida para a matriz cereais/ bolachas.

	2 ng/mL	100 ng/mL
n	10	10
n-1	9	9
Média (yn)	46741,5	799846,2
Desvio padrão (yn)	26282,94	34782,15
Desvio padrão relativo (yn)	56,23%	4,35%
Variância (Sn)	6,91E+08	1,21E+09
PG		1,75
F_(n1-1, n10-1, 99,0 %) =		5,35
Critério de Aceitação: SIM		

Para a extração convencional por solventes os limites de repetibilidade dos parâmetros área do pico cromatográfico, razão iónica e tempo de retenção, representados na tabela 4.9, encontram-se abaixo da maior diferença absoluta entre dois ensaios consecutivos, e o coeficiente de variação médio associado também é aceite pelos critérios já referidos anteriormente. O teste da homogeneidade de variâncias verifica que as diferenças entre as variâncias não são significativas, pois o cálculo do valor teste (PG) é inferior ao valor tabelado da distribuição F de *Snedecor / Fisher* para uma confiança de 99%, logo a gama de trabalho está bem ajustada.

Para a extração em fase sólida as conclusões são semelhantes, à exceção que neste método o limite de repetibilidade e, conseqüentemente, o coeficiente de variação médio para a razão iónica no nível de concentração de 2 ng/mL encontram-se ligeiramente fora do intervalo válido, devido às interferências do aparelho na medição de concentrações mais baixas.

4.1.4. Precisão Intermédia

A precisão intermédia ou reprodutibilidade intralaboratorial é a medida mais adequada para a representatividade da variabilidade dos resultados no laboratório em estudo. De modo a determinar a precisão intermédia para os dois métodos de extração na matriz bolachas/ cereais efetuaram-se três medições a cada matriz em condições de repetibilidade em três dias diferentes, sendo esta a condição que variou para o cálculo da reprodutibilidade intralaboratorial.

Para a extração em fase sólida apenas será avaliada a precisão intermédia para o nível de fortificação de 20 µg/kg, tal como no teste de especificidade/ seletividade, visto que não se sentiu a necessidade de avaliar para o nível de fortificação seguinte.

Na extração convencional por solventes, com a utilização das soluções *Carrez I* e *II*, a reprodutibilidade intralaboratorial foi estudada para os níveis de fortificação de 20 mg/kg e 40 mg/kg, bem como foi efetuado nas taxas de recuperação do mesmo método.

A precisão intermédia pode ser expressa quantitativamente em forma de desvio, calculado pela equação 2.4, ou em forma de percentagem, dividindo o valor da precisão intermédia pela média associada aos nove ensaios efetuados, ambos os parâmetros tal como o coeficiente de variação médio estão representados nas tabelas 4.14, 4.15 e 4.16.

Tabela 4.14 - Precisão Intermédia para a extração em fase sólida na matriz cereais/ bolachas.

Data	[Fortificada] teórica (µg/kg)	[Fortificada] prática (µg/kg)	Média (N=9)	Desvio Padrão (N=9)	Precisão Intermédia (N=9)	Precisão Intermédia (%) (N=9)	Coefficiente de Variação (%) (N=9)
4/05/2021	20	20,53	21,03	0,6661	0,7121	3,39%	3,17%
		22,16					
		21,23					
14/05/2021	20	20,19					
		21,69					
		20,55					
20/05/2021	20	20,41					
		20,98					
		21,50					

Tabela 4.15 - Precisão Intermédia para a extração por solventes na matriz cereais/ bolachas, fortificada a 20 µg/kg.

Data	[Fortificada] teórica (µg/kg)	[Fortificada] prática (µg/kg)	Média (N=9)	Desvio Padrão (N=9)	Precisão Intermédia (N=9)	Precisão Intermédia (%) (N=9)	Coefficiente de Variação (%) (N=9)
30/8/2021	20	23,26	22,93	1,2902	1,3793	6,01%	5,63%
		20,48					
		23,98					
06/09/2021	20	23,11					
		24,97					
		23,67					
28/09/2021	20	22,26					
		22,68					
		22,00					

Tabela 4.16 - Precisão Intermédia para a extração por solventes na matriz cereais/ bolachas, fortificada a 40 µg/kg.

Data	[Fortificada] teórica (µg/kg)	[Fortificada] prática (µg/kg)	Média (N=9)	Desvio Padrão (N=9)	Precisão Intermédia (N=9)	Precisão Intermédia (%) (N=9)	Coefficiente de Variação (%) (N=9)
30/8/2021	40	38,82	39,37	1,5868	1,6964	4,31%	4,03%
		39,56					
		41,38					
06/09/2021	40	37,70					
		39,23					
		37,91					
28/09/2021	40	37,62					
		40,07					
		42,06					

Para a extração em fase sólida, a uma concentração de fortificação de 20 µg/kg, obteve-se um desvio de precisão intermédia de, aproximadamente, 0,7121, em termos de percentagem de 3,39%, e o coeficiente de variação médio associado às nove medições dos três dias é de 3,17%.

Na extração convencional por solventes ao nível de concentração de 20 µg/kg de acrilamida, a precisão intermédia é, aproximadamente, 1,3793 em formato de desvio e 6,01% em representação percentual, apresentando o método para esta concentração um coeficiente de variação de 5,63%, enquanto para a concentração de 40 µg/kg de acrilamida o desvio da precisão intermédia é 1,6964, aproximadamente, e 4,31%, percentualmente, e o coeficiente de variação é 4,03%.

Conclui-se, por tanto, que todos os resultados obtidos para a validação da reprodutibilidade intralaboratorial são satisfatórios e aceites pelas normas exigidas pelo laboratório.

4.1.5. Limites Analíticos

De acordo com os parâmetros de linearidade associados às curvas de calibração, por extração com solventes e em fase sólida, para a matriz cereais/ bolachas, é possível alcançar uma estimativa dos limites analíticos correspondentes às curvas, estes encontram-se nas tabelas seguintes, e foram calculados através das equações 2.5 e 2.6.

Para a extração convencional por solventes, com as soluções Carrez I e II, obteve-se um limite de quantificação de 3,43 µg/kg e um limite de deteção de 10,40 µg/kg. Na extração em fase sólida os limites analíticos atingidos são superiores em relação aos anteriores, o limite de deteção é de 7,49 µg/kg e o limite de quantificação de 22,69 µg/kg.

Para ambos os métodos o limite de quantificação encontra-se acima da concentração mais pequena da gama de trabalho, limite este que define a partir de que concentração é possível quantificar a acrilamida com determinada certeza e precisão. No entanto, como apenas são reportados resultados acima dos 20 µg/kg, limite de quantificação prático estipulado pela comissão europeia para a acrilamida, não existe conflito abaixo deste limite. Especificamente para a extração em fase sólida obteve-se um L.Q. ligeiramente superior a 20 µg/kg, mas que não interfere gravemente na quantificação do analito.

Tabela 4.17 - Limites analíticos para a extração convencional por solventes em matriz cereais/bolachas.

Declive (b)	1495,23
Ordenada na origem (a)	2418,84
Coeficiente de correlação (R)	0,9997
Coeficiente de determinação (R²)	0,9994
Sensibilidade (e)	1495,23
Desvio padrão residual da reta (Sy/x)	1555,47
Limite de Deteção (L.D.)	3,43
Limite de Quantificação (L.Q.)	10,40

Tabela 4.18 - Limites analíticos para a extração em fase sólida em matriz cereais/bolachas.

Declive (b)	4529,32
Ordenada na origem (a)	-7551,48
Coefficiente de correlação (R)	0,998614
Coefficiente de determinação (R²)	0,997231
Sensibilidade (e)	4529,32
Desvio padrão residual da reta (Sy/x)	10275,28
Limite de Detecção (L.D.)	7,49
Limite de Quantificação (L.Q.)	22,69

4.1.6. Efeito Matriz

Para o cálculo do efeito matriz nos alimentos bolachas/cereais foi injetada uma reta em solvente no mesmo dia que foi injetada a curva de calibração da matriz em questão, com concentrações de acrilamida iguais para ambas as retas.

Para a extração convencional por solventes com as soluções *Carrez*, foi injetada uma reta onde o solvente utilizado foi a solução aquosa de ácido acético e, para a extração em fase sólida, o solvente foi a solução aquosa de ácido fórmico.

Tabela 4.19 - Efeito matriz para a extração convencional com as soluções *Carrez* na matriz bolachas/cereais

Concentração (ng/mL)	Área do pico da amostra com adição de padrão	Área do pico da solução com o analito em solvente	Efeito Matriz (%)
2	7985	8534	-6,43%
10	21397	22240	-3,79%
25	44864	47690	-5,93%
50	78217	74690	4,72%
75	118171	119700	-1,28%
100	155806	161200	-3,35%

Tabela 4.20 - Efeito matriz para a extração em fase sólida na matriz bolachas/cereais

Concentração (ng/mL)	Área do pico da amostra com adição de padrão	Área do pico da solução com o analito em solvente	Efeito Matriz (%)
2	8108	7807	3,86%
10	39694	40600	-2,23%
25	100956	102136	-1,16%
50	240420	246700	-2,55%
75	330790	313100	5,65%
100	448201	432109	3,72%

Verifica-se pelos resultados apresentados acima que os efeitos matrizes neste tipo de alimentos com esta extração não são significativos, visto que os valores obtidos são, relativamente, perto de 0%, e que na maioria existe mais supressão de picos do que intensificação devido aos interferentes presentes naturalmente neste tipo de amostras alimentares.

4.1.7. Cromatograma

De seguida são apresentados os cromatogramas obtidos de amostras reais incluídas no grupo de matriz bolachas/cereais. Através das figuras seguintes, é possível identificar o pico cromatográfico da acrilamida da amostra e da fortificada a 20 µg/kg, extraídas pelas soluções Carrez e pela extração em fase sólida.

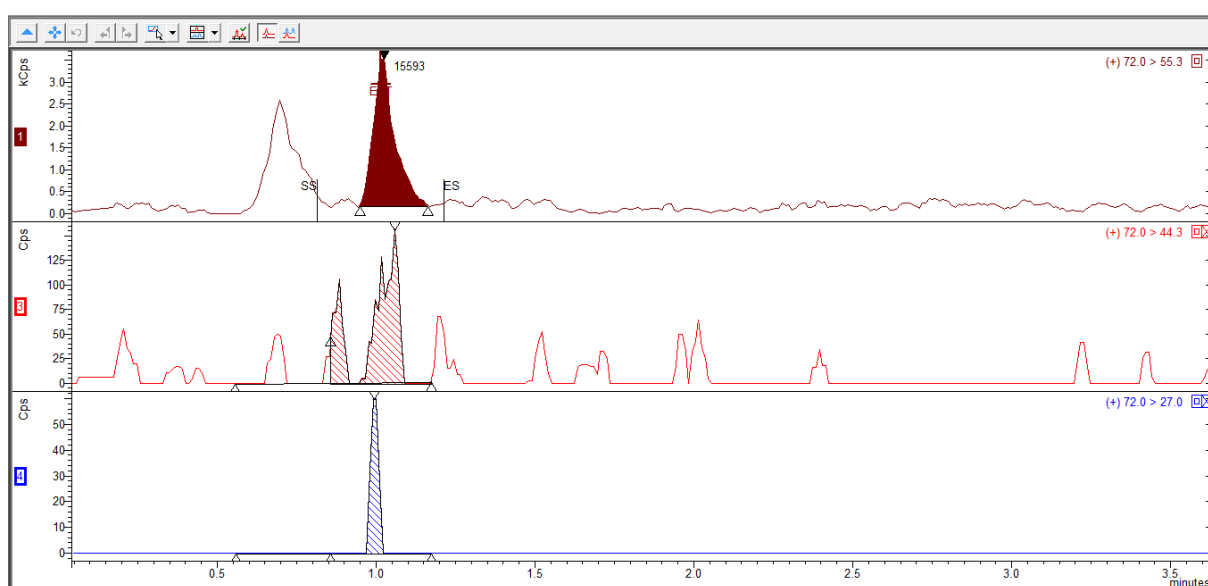


Figura 4.5 - Cromatograma de uma amostra representativa da matriz bolachas/cereais para a extração convencional com as soluções Carrez.

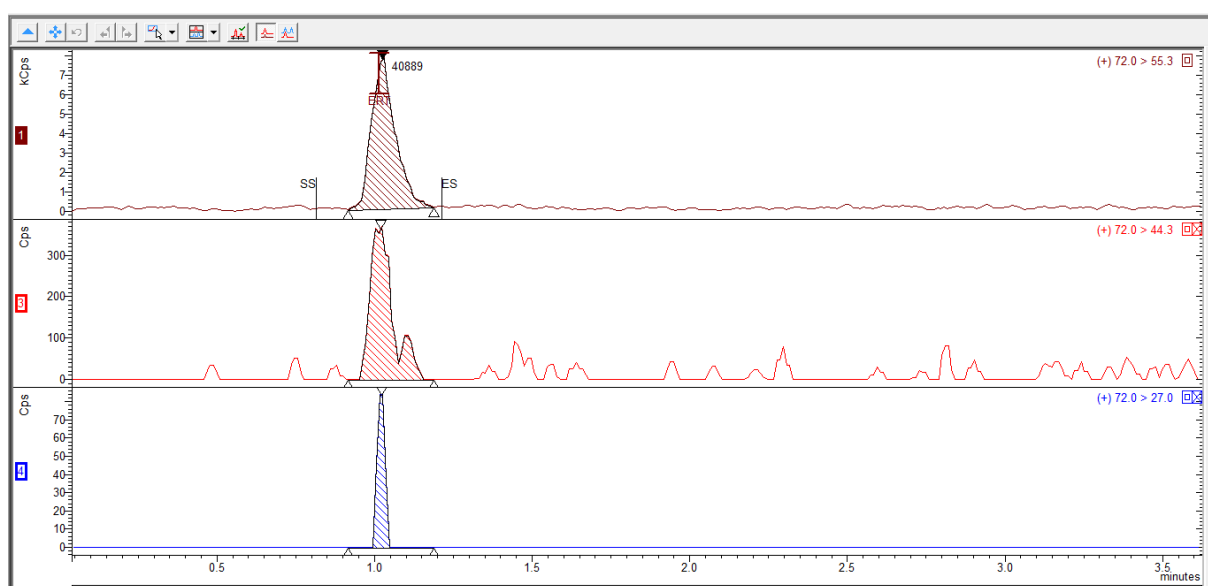


Figura 4.6 - Cromatograma de uma amostra fortificada representativa da matriz bolachas/cereais para a extração convencional com as soluções Carrez.

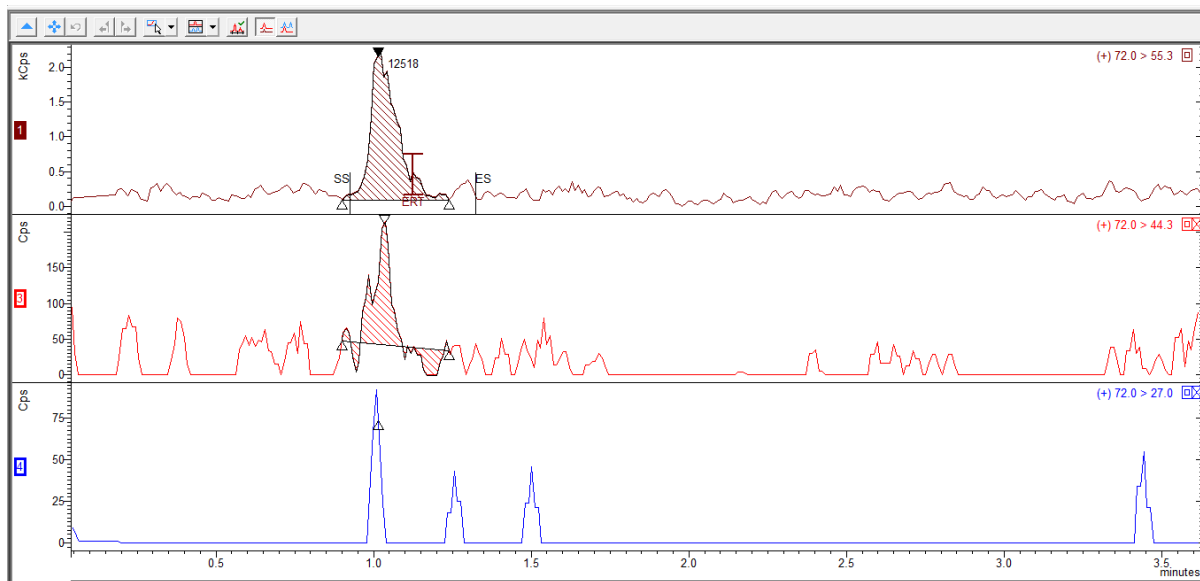


Figura 4.7 - Cromatograma de uma amostra representativa da matriz bolachas/cereais para a extração em fase sólida.

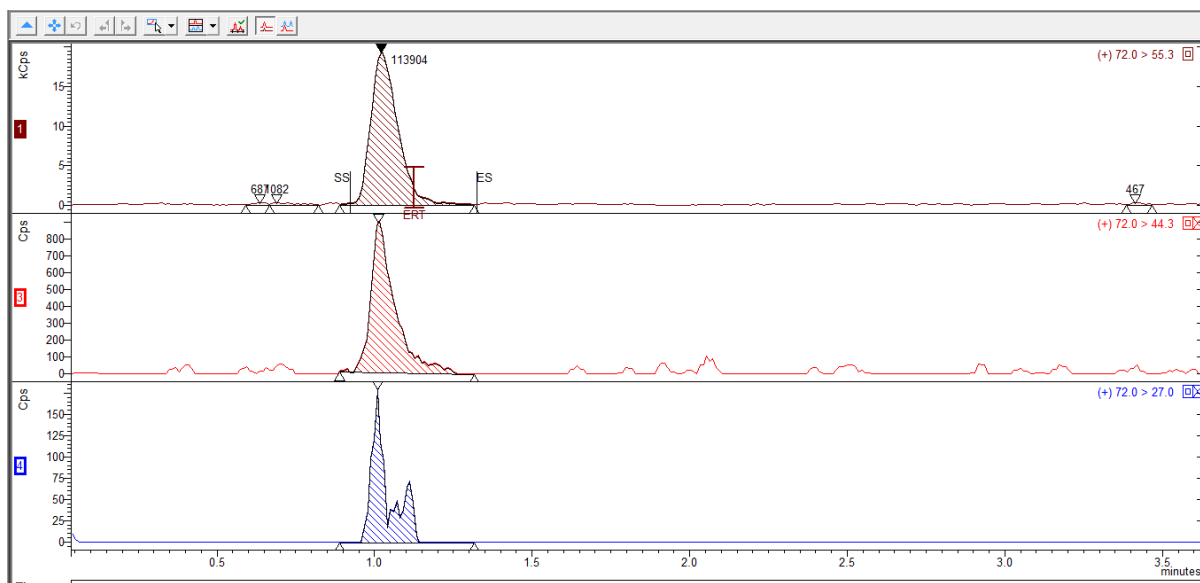


Figura 4.8 - Cromatograma de uma amostra fortificada representativa da matriz bolachas/cereais para a extração em fase sólida.

4.2. Validação da matriz batatas fritas

A validação do método para a quantificação de acrilamida nas batatas fritas foi efetuada somente para a extração em fase sólida, visto que após alguns testes se verificou que a extração convencional com as soluções *Carrez* I e II não se aplica a este tipo de alimentos devido ao seu alto teor de gordura e interferentes, que não são eliminados durante o processo de extração com solventes.

Assim, a extração em fase sólida foi principalmente aplicada no laboratório para a detecção e quantificação de acrilamida neste tipo de matrizes, onde se conseguiu atingir, no geral, resultados válidos.

4.2.1. Especificidade / Seletividade

Para a extração em fase sólida na matriz batatas fritas foram executadas medições de fortificação a concentrações de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, de modo a obter taxas de recuperação aceitáveis para os dois níveis de fortificação.

Ao nível de fortificação de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ alcançou-se taxas de recuperação entre 86,53% e 103,22%, e no segundo nível de fortificadas analisadas o intervalo das taxas de recuperação foi de 88,10% a 131,93%, todas as taxas cumprem os limites estabelecidos.

Os ensaios foram realizados em condições independentes, e os resultados estão apresentados na tabela 4.21.

Tabela 4.21 - Taxas de recuperação para extração em fase sólida na matriz batatas fritas.

Nível de Fortificação	[Analito adicionado] ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	[Amostra] ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	[Fortificada] ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	[Fortificada]-[Amostra]	Taxa de Recuperação (%)
1°	20	1,71	20,15	18,44	92,19%
		1,31	18,62	17,31	86,53%
		1,34	19,41	18,07	90,36%
		12,38	31,96	19,58	97,91%
		14,53	35,17	20,64	103,22%
2°	40	2,70	42,87	40,17	100,42%
		3,72	38,96	35,24	88,10%
		4,16	47,43	43,27	108,17%
		12,43	53,32	40,88	102,21%
		20,41	73,18	52,77	131,93%

Foi realizada uma estimativa da média, do desvio padrão e do coeficiente médio de variação para a extração em fase sólida, ao nível de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, de modo a avaliar a variabilidade da recuperação em cada nível de fortificação, representados na tabela 4.22.

O coeficiente médio de variação para o primeiro nível de fortificação é de 6,99% e para o segundo nível é de 9,76%, ambos se encontram abaixo do limite pré-definido de 10%, logo pode-se concluir que os resultados das taxas de recuperação não apresentam uma dispersão significativa entre as concentrações de fortificadas analisadas.

A média dos resultados para a extração em fase sólida, para as amostras fortificadas com uma concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, é de 94,04% e, para as amostras fortificadas com uma concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, é de 105,19%, como seria de esperar a média das taxas de recuperação associadas a um nível de concentração mais elevado é por norma também mais alto.

Tabela 4.22 - Média, Desvio padrão e coeficiente de variação média para as taxas de recuperação da matriz batatas fritas.

	Média	Desvio Padrão	CVm (%)
Extração em fase sólida (Fortificada a 20 µg/kg)	94,04%	0,06569138	6,99%
Extração em fase sólida (Fortificada a 40 µg/kg)	105,19%	0,10262076	9,76%

4.2.2. Gama de trabalho e Linearidade

A elaboração da curva de calibração para a matriz batata frita, por extração em fase sólida, foi realizada através de cinco pontos uniformemente distribuídos ao longo da gama de trabalho, a concentração de acrilamida adicionada e a área do pico cromatográfico, sem o analito naturalmente presente na amostra, encontram-se expostos na tabela 4.23.

A curva de calibração, com a respetiva linha de tendência, está representada graficamente na figura 4.9 e permite elaborar uma pré-análise da linearidade da mesma, através do coeficiente de determinação que deve ser aproximadamente igual a 1.

Tabela 4.23 - Concentrações dos pontos da curva de calibração com as respetivas áreas dos picos cromatográficos para a matriz batatas fritas, por extração em fase sólida.

Pontos da Curva de Calibração	Concentração (ng/mL)	Área do pico ⁽¹⁾
1	2	62459
2	10	425133
3	25	1203258
4	50	2525493
5	100	5068506

(1) A área do pico corresponde à área mensurada pelo aparelho descontando o valor da área da amostra, de modo a retirar a quantidade de acrilamida naturalmente presente na matriz.

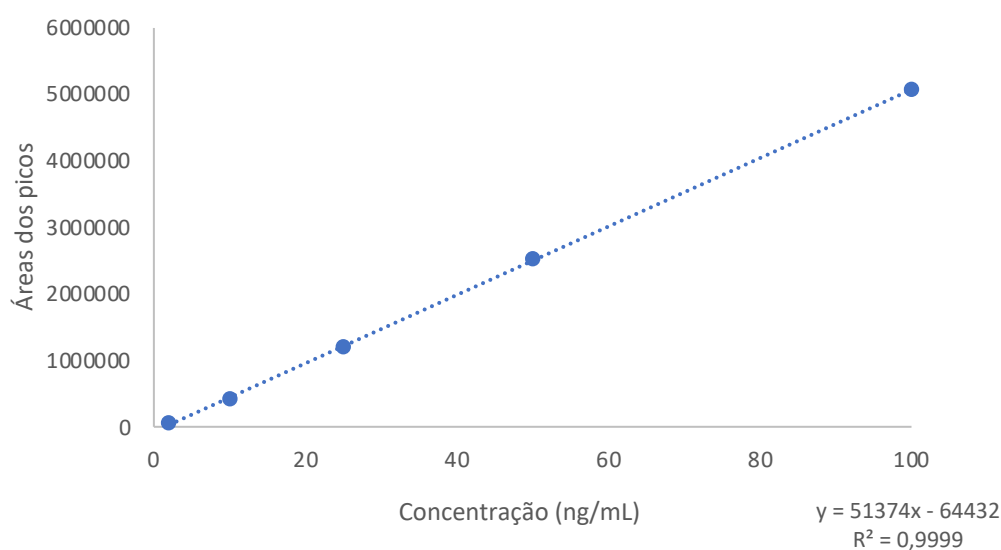


Figura 4.9 - Curva de calibração para a matriz batatas fritas com a respetiva linha de tendência, por extração em fase sólida.

Conclui-se pela construção gráfica dos resultados obtidos através curva de calibração para a matriz batatas fritas que esta pode ser considerada, à priori, linear, visto que o r^2 da linha de tendência é de 0,9999.

Como foi realizado anteriormente para a matriz bolachas/cereais, foi aplicado também nesta matriz o método dos mínimos quadrados à reta de calibração, reconhecendo a exatidão da linearidade da mesma e, assim, conseguir validar a mesma para todas as amostras de batatas fritas.

Os resultados alcançados para a determinação da linearidade da curva de calibração da matriz batatas fritas, por extração em fase sólida, estão apresentadas na tabela 4.24, onde se verifica um coeficiente médio de variação do método de 1,32%, logo abaixo dos 10% definidos para o mesmo ser considerado um critério de aceitação válido.

Tabela 4.24 - Linearidade respetiva à curva de calibração com a extração em fase sólida para a matriz batatas fritas.

Declive (b)	51374,39
Ordenada na origem (a)	-64432,38
Coeficiente de correlação (R)	0,9999
Coeficiente de determinação (R²)	0,9999
Sensibilidade (e)	51374,39
Desvio padrão residual da reta (Sy/x)	25267,10
Desvio padrão do declive (Sb)	319,99
Desvio padrão da ordenada na origem (Sa)	12267,96
Desvio padrão do método (Sm)	0,49
Coeficiente de Variação do método (%)	1,32%
Critério de Aceitação (%)	SIM

Tal como anteriormente, a análise dos resíduos amostrais foi também realizada para a curva de calibração da matriz batatas fritas, de modo a verificar se há valores discrepantes e se os mesmos apresentam um comportamento homoscedástico, tanto através do cálculo do resíduo como da representação gráfica de todos os resíduos obtidos.

É possível verificar que no ponto de concentração de 2 ng/mL o resíduo amostral é de -63,01%, logo não é aceite pelos critérios definidos. Este valor encontra-se fora da gama válida pela mesma razão apresentada na validação anterior, pois a concentrações mais baixas o aparelho de medição não é tão sensível logo pode existir algumas interferências na resposta do mesmo, e, conseqüentemente, na concentração medida para a acrilamida. Contudo, não são reportados valores abaixo do limite de quantificação prático, definido pela comissão europeia, para as amostras de batatas fritas, logo as discrepâncias de valores a este nível não afetam diretamente o resultado fornecido pelo laboratório aos clientes.

É de notar que a variância entre a área do pico cromatográfico medido e estimado diminui com o aumento da concentração associada ao pico, corroborando a explicação anterior, que quanto maior for a área do pico melhor será efetuada a sua deteção e quantificação, diminuindo intrinsecamente o resíduo amostral associado.

Tabela 4.25 - Determinação da gama de linearidade através da análise dos resíduos para a matriz batatas fritas, por extração em fase sólida.

Concentração (ng/mL)	Área do Pico	Área do pico estimada	Resíduo	Critério de Aceitação (<10%)
2	62459	38316,4004	-63,01%	NO
10	425133	449311,519	5,38%	YES
25	1203258	1219927,366	1,37%	YES
50	2525493	2504287,112	-0,85%	YES
75	5068506	5073006,603	0,09%	YES

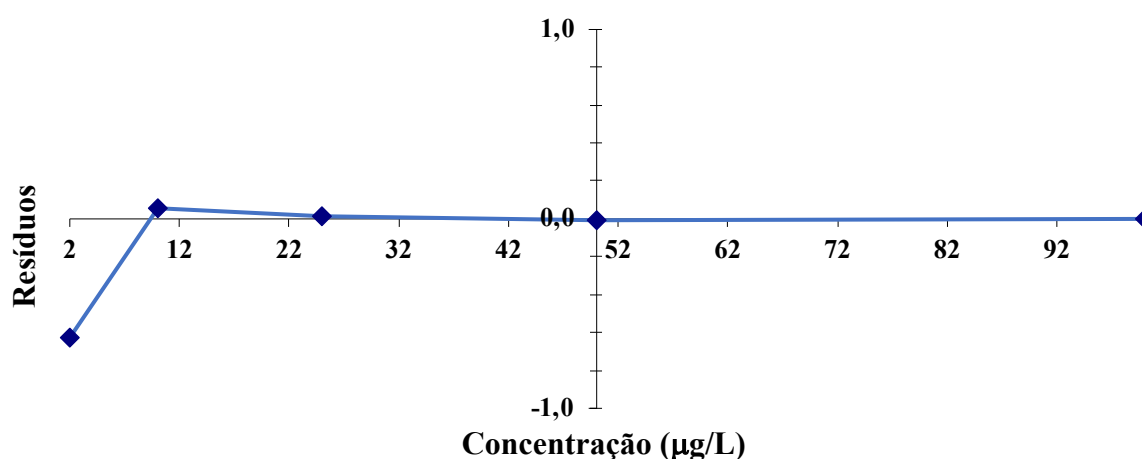


Figura 4.10 - Gráfico da análise de resíduos referente à matriz cereais/bolachas, por extração em fase sólida.

4.2.3. Repetibilidade

A repetibilidade para a matriz batatas fritas foi avaliada através de 10 ensaios independentes ao nível mais baixo e mais alto da curva de calibração, 2 ng/mL e 100 ng/mL, com o cálculo da média, variância e desvio padrão da área do pico cromatográfico, tempo de retenção e razão iônica é possível estimar o limite de repetibilidade para cada um dos parâmetros do aparelho cromatográfico e verificar que o desvio padrão das respostas do mesmo se encontram abaixo do limite obtido.

O coeficiente de variação calculado para cada um dos parâmetros supramencionados para as concentrações estipuladas encontram-se todos abaixo do limite máximo de 10%, logo pode-se concluir que para a extração em fase sólida desta matriz existe condições de repetibilidade.

Tabela 4.26 - Repetibilidade ao nível do PC1 e do PC2 da curva de calibração, com o respetivo coeficiente de variação para a matriz batatas fritas, com extração em fase sólida.

2 ng/mL (PC1)			100 ng/mL (PC2)		
Área do Pico	Tempo de Retenção	Razão Iónica	Área do Pico	Tempo de Retenção	Razão Iónica
224631	1,536	4,50%	4217651	1,536	4,20%
233151	1,536	4,60%	4200445	1,538	4,30%
228346	1,536	5,10%	4159192	1,537	4,10%
275154	1,528	4,00%	4091074	1,532	4,10%
233033	1,537	4,60%	3990808	1,538	4,20%
238231	1,53	4,20%	4237156	1,524	4,40%
244583	1,531	3,80%	3942590	1,526	4,20%
274206	1,527	4,00%	4197971	1,529	4,10%
254147	1,537	5,00%	4210201	1,526	4,10%
204711	1,45	4,40%	4231206	1,535	4,00%

Média	241019,30	1,52	4,42%	4147829,40	1,53	4,17%
Variância	4,81E+08	7,06E-04	1,84E-05	1,10E+10	2,97E-05	1,34E-06
Desvio Padrão	21940,62	2,66E-02	4,29E-03	104938,06	5,45E-03	1,16E-03
Limite de repetibilidade (r)	61433,75	7,44E-02	1,20E-02	293826,57	1,52E-02	3,25E-03
CVr (%)	9,10%	1,74%	9,70%	2,53%	0,36%	2,78%
Critério de Aceitação	YES	YES	YES	YES	YES	YES

O teste da homogeneidade de variâncias foi aplicado para verificar se a gama de trabalho estava bem ajustada a esta matriz com a extração em fase sólida, o que poder ser considerado verdade visto que o valor teste se encontra abaixo do valor tabelado da distribuição F de *Snedecor / Fisher* para uma confiança de 99%, como se pode observar na tabela 4.27.

Tabela 4.27 - Homogeneidade de variâncias para a determinação da gama de trabalho, relativamente aos resultados de repetibilidade com a extração em fase sólida na matriz batatas fritas.

	2 ng/mL	100 ng/mL
n	10	10
n-1	9	9
Média (yn)	241019,3	4,15E+06
Desvio padrão (yn)	21940,62	1,05E+05
Desvio padrão relativo (yn)	9,10%	2,53%
Variância (Sn)	481390952,7	1,10E+10
PG		4,78
F_(n1-1, n10-1, 99,0 %) =		5,35
Critério de Aceitação: SIM		

4.2.4. Precisão Intermédia

Para o cálculo da precisão intermédia para a matriz batatas fritas foram efetuadas três medições, em condições de repetibilidade, para amostras fortificadas a 20 µg/kg e 40 µg/kg. O parâmetro que variou para o cálculo da precisão intermédia foram os dias das análises, tendo as amostras sido analisadas em três dias diferentes, obtendo-se um total de nove resultados ao longo dos três dias.

Ao nível de concentração de fortificada de 20 µg/kg foi obtido em formato de desvio para a precisão intermédia um valor de 1,1044, percentualmente de 5,37%, e um coeficiente de variação de 4,15%. Para um nível de concentração de 40 µg/kg alcançou-se uma precisão intermédia de 2,6459, em percentagem de 6,32%, e um coeficiente de variação de 3,56%. Pode-se concluir, assim, que todos os resultados obtidos para a validação da reprodutibilidade intra-laboratorial, para a matriz batatas fritas, são satisfatórios e aceites pelas normas exigidas pelo laboratório.

Tabela 4.28 - Precisão Intermédia para a extração em fase sólida na matriz batatas fritas.

Data	[Fortificada] teórica (µg/kg)	[Fortificada] prática (µg/kg)	Média (N=9)	Desvio Padrão (N=9)	Precisão Intermédia (N=9)	Precisão Intermédia (%) (N=9)	Coefficiente de Variação (%) (N=9)
14/05/2021	20	20,53	20,55	0,8523	1,1044	5,37%	4,15%
		22,16					
		21,23					
29/05/2021	20	20,19					
		21,69					
		20,55					
09/06/2021	20	20,41					
		20,98					
		21,50					

Tabela 4.29 - Precisão Intermédia para a extração em fase sólida na matriz batatas fritas, fortificada a 40 µg/kg.

Data	[Fortificada] teórica (µg/kg)	[Fortificada] prática (µg/kg)	Média (N=9)	Desvio Padrão (N=9)	Precisão Intermédia (N=9)	Precisão Intermédia (%) (N=9)	Coefficiente de Variação (%) (N=9)
14/05/2021	40	42,89	41,86	1,4922	2,6459	6,32%	3,56%
		44,42					
		42,82					
29/05/2021	40	42,44					
		41,09					
		41,46					
09/06/2021	40	40,09					
		39,61					
		41,93					

4.2.5. Limites Analíticos

Em concordância com os parâmetros de linearidade associados à curva de calibração da matriz batatas fritas, obteve-se os limites analíticos correspondentes através das equações 2.5 e 2.6, que se encontram representados na tabela 4.30.

O limite de detecção atingido é de 1,62 µg/kg e o limite de quantificação é de 4,92 µg/kg, que apesar de se encontrar acima do padrão de menor concentração da gama de trabalho, como na matriz anteriormente analisada, não interfere de modo significativo nos resultados intralaboratoriais, podendo, assim, assumir-se estes limites analíticos válidos.

Tabela 4.30 - Limites analíticos para a extração em fase sólida em matriz batatas fritas.

Declive (b)	51374,39
Ordenada na origem (a)	-64432,38
Coefficiente de correlação (R)	0,9999
Coefficiente de determinação (R²)	0,9999
Sensibilidade (e)	51374,39
Desvio padrão residual da reta (Sy/x)	25267,10
Limite de Quantificação (L.Q.)	1,62
Limite de Detecção (L.D.)	4,92

4.2.6. Efeito Matriz

Na matriz batatas fritas apenas foi injetada a reta com a solução aquosa de ácido fórmico, visto que a extração aplicada a este método foi apenas a extração em fase sólida, no mesmo dia e condições que foi injetada a curva de calibração. Para ambas as extrações o efeito matriz foi obtido através da equação 2.7 e os resultados encontram-se na seguinte tabela.

Tabela 4.31 - Efeito matriz para a extração em fase sólida na matriz batatas fritas

Concentração (ng/mL)	Área do pico da amostra com adição de padrão	Área do pico da solução com o analito em solvente	Efeito Matriz (%)
2	64670	62459	-3,42%
10	436200	425133	-2,54%
25	1107000	1203258	8,70%
50	2630100	2525493	-3,98%
100	5060000	5068506	0,17%

Tal como anteriormente, também neste tipo de matrizes obteve-se que o efeito matriz neste tipo de alimentos não é significativo, conclusão retirada pelos valores percentuais apresentados na tabela 4.31.

4.2.7. Cromatograma

As seguintes figuras representam os cromatogramas obtidos de amostras reais da categoria batatas fritas. Através das figuras seguintes, é possível identificar o pico cromatográfico da acrilamida da amostra e da fortificada a 20 µg/kg, que foram extraídas pela extração em fase sólida.

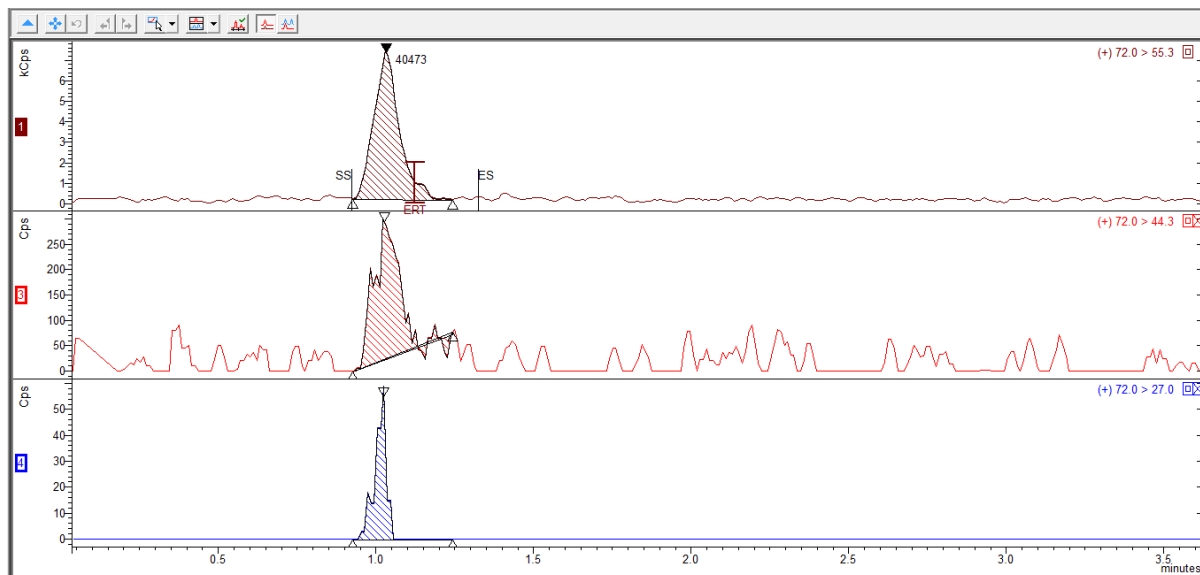


Figura 4.11 - Cromatograma de uma amostra representativa da matriz batatas fritas para a extração em fase sólida.

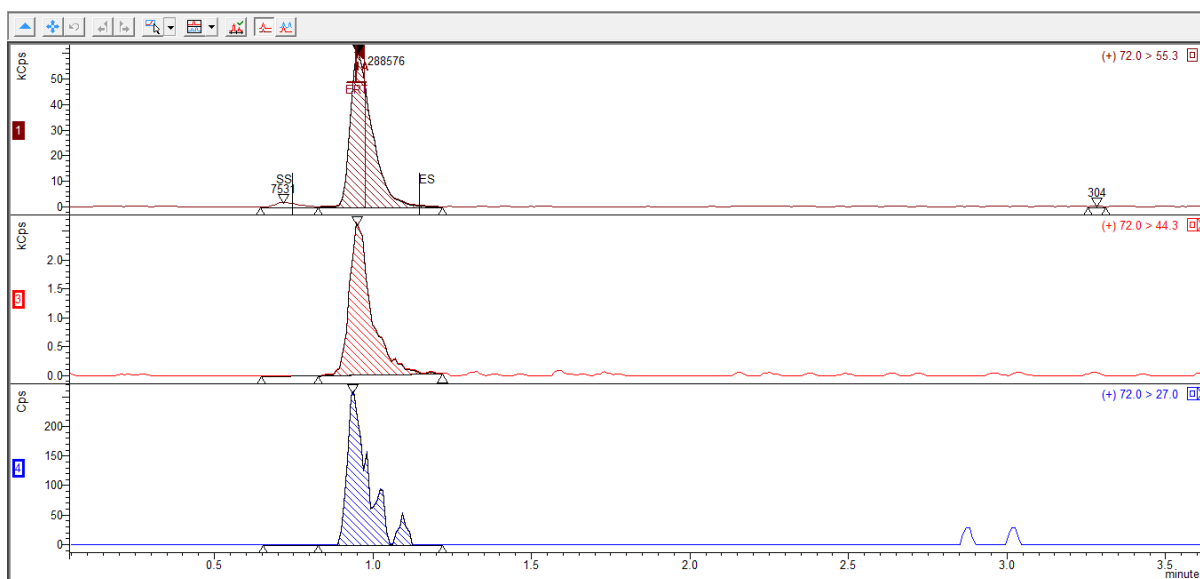


Figura 4.12 - Cromatograma de uma amostra fortificada representativa da matriz batatas fritas para a extração em fase sólida.

4.3. Validação da matriz pão

Ao contrário da matriz analisada anteriormente, a matriz pão só será validado pelo método de extração convencional por solventes, com as soluções Carrez I e II, visto que nunca se sentiu a necessidade, ao longo dos testes realizados para a dissertação, da análise deste tipo de amostras pelo método de extração em fase sólida, que como é um método com um custo mais elevado apenas é utilizado em matrizes onde se justifica a sua aplicação.

4.3.1. Especificidade / Seletividade

A especificidade e seletividade para a extração em fase sólida na matriz pão foi averiguada pela fortificação de amostras a concentrações de 20 µg/kg e 40 µg/kg com o objetivo de atingir taxas de recuperação válidas para os dois níveis de fortificação, os resultados estão apresentados na tabela 4.32 e os ensaios foram realizados, tal como nas validações anteriores, em condições independentes.

No primeiro nível de fortificação obteve-se taxas de recuperação entre 95,67% e 124,61%, e no nível de fortificação de 40 µg/kg foi atingido um intervalo das taxas de recuperação de 97,59% a 111,85%, deduzindo assim que as taxas apresentadas encontram-se dentro dos limites estabelecidos no laboratório.

Tabela 4.32 - Taxas de recuperação para extração com solventes na matriz pão.

Nível de Fortificação	[Analito adicionado] (µg/kg)	[Amostra] (µg/kg)	[Fortificada] (µg/kg)	[Fortificada]-[Amostra]	Taxa de Recuperação (%)
1°	20	1,02	20,72	19,70	98,50%
		0,69	19,82	19,13	95,67%
		1,63	23,83	22,20	111,00%
		9,10	28,39	19,30	96,48%
		22,62	47,54	24,92	124,61%
2°	40	6,51	45,55	39,03	97,59%
		0,08	39,61	39,53	98,82%
		1,33	41,57	40,24	100,59%
		29,41	71,74	42,34	105,84%
		40,91	85,65	44,74	111,85%

O cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente médio de variação para a extração convencional por solventes, na matriz pão, ao nível de 20 µg/kg e de 40 µg/kg, encontra-se representado na tabela 4.33, e teve como objetivo a avaliação da robustez da recuperação nos dois níveis de fortificação.

Tabela 4.33 - Média, Desvio padrão e coeficiente de variação média para as taxas de recuperação da matriz pão.

	Média	Desvio Padrão	CVm (%)
Extração com solventes (Fortificada a 20 µg/kg)	99,25%	0,067235315	6,77%
Extração com solventes (Fortificada a 40 µg/kg)	102,94%	0,058919313	5,72%

A média estimada das taxas de recuperação dos resultados da matriz pão, para as amostras fortificadas com uma concentração de 20 µg/kg, é de 99,25% e, para as amostras fortificadas com uma concentração de 40 µg/kg, é de 102,94%, ambas muito próximas do valor ideal de 100%, concluindo que a taxa de recuperação por este método extrativo neste tipo de alimento é bastante satisfatória por se aproximar às expectativas teóricas.

O coeficiente médio de variação calculado para o nível de fortificação de 20 µg/kg é de 6,77% e para o segundo nível é de 5,72%, ambos se encontram abaixo do limite pré-definido de 10%, logo pode-se concluir que os resultados das taxas de recuperação não apresentam uma dispersão significativa entre as concentrações de fortificadas analisadas.

Em suma, pode-se afirmar que o método de extração convencional com as soluções Carrez I e II é específico e seletivo para a matriz pão, ou seja, o analito acrilamida é extraído corretamente da matriz em questão, não existindo interferências significativas que influenciam os resultados obtidos.

4.3.2. Gama de trabalho e Linearidade

A preparação da curva de calibração para a matriz pão, por extração com as soluções Carrez, foi realizada através de seis pontos distribuídos homogeneamente ao longo da gama de trabalho, representados na tabela 4.34 juntamente com a concentração de acrilamida adicionada e a área do pico cromatográfico.

A representação gráfica da curva de calibração, com a respetiva linha de tendência, encontra-se na figura 4.13, e esta irá permitir verificar a estabilidade da calibração entre a resposta do sistema com a concentração de acrilamida conhecida com o apoio do coeficiente de correlação, r superior a 0,995, ou do coeficiente de determinação, r^2 o mais próximo de 1 que seja possível.

Tabela 4.34 - Concentrações dos pontos da curva de calibração com as respetivas áreas dos picos cromatográficos para a matriz pão, por extração convencional por solventes.

Pontos da Curva de Calibração	Concentração (ng/mL)	Área do pico ⁽¹⁾
1	2	4711
2	10	29346
3	25	75957
4	50	158004
5	75	227755
6	100	296266

- (1) A área do pico corresponde à área mensurada pelo aparelho descontando o valor da área da amostra, de modo a retirar a quantidade de acrilamida naturalmente presente na matriz.

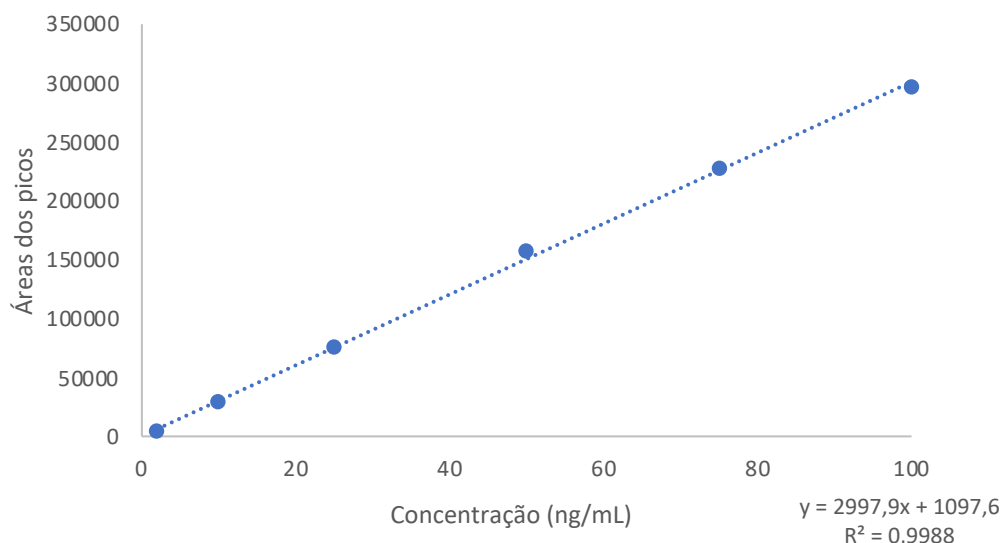


Figura 4.13 - Curva de calibração para a matriz pão com a respetiva linha de tendência, por extração convencional por solventes.

Verifica-se pela figura 4.13 que os resultados obtidos através da curva de calibração para a matriz pão que esta pode ser considerada estável e linear, visto que o r^2 da linha de tendência é de 0,9988, muito próximo do valor 1 como seria esperado.

Decidiu-se aplicar, tal como nas validações anteriores, nesta matriz o método dos mínimos quadrados à reta de calibração, reconhecendo a veracidade das conclusões sobre a linearidade da mesma e, assim, conseguir validar a curva para todas as amostras de pão analisadas no laboratório na sua rotina diária.

Os resultados atingidos para a determinação da linearidade da curva de calibração da matriz pão, por extração com as soluções *Carrez*, estão apresentados na tabela 4.35, onde se verifica um coeficiente médio de variação do método de 0,40%, logo um valor muito inferior dos 10% definidos para o mesmo ser considerado um critério de aceitação válido.

Tabela 4.35 - Linearidade respetiva à curva de calibração com a extração convencional por solventes para a matriz pão.

Declive (b)	25707,75
Ordenada na origem (a)	10138,53
Coefficiente de correlação (R)	1,00
Coefficiente de determinação (R²)	1,00
Sensibilidade (e)	25707,75
Desvio padrão residual da reta (Sy/x)	4541,24
Desvio padrão do declive (Sb)	52,74
Desvio padrão da ordenada na origem (Sa)	2414,06
Desvio padrão do método (Sm)	0,18
Coefficiente de Variação do método (%)	0,40%
Critério de Aceitação (%)	SIM

Tal como nas validações anteriores, a análise residual foi também realizada para a curva de calibração do pão, de modo a verificar a existência de valores irregulares, tanto através do cálculo do resíduo como da representação gráfica de todos os resíduos amostrais obtidos.

No ponto de concentração de 2 ng/mL observa-se uma diferença relevante entre a área do pico da resposta do sistema e a área do pico estimada, o que resulta num resíduo amostral de 33,59%, que não é aceite pelos critérios definidos. Este valor encontra-se fora da gama válida, pela mesma razão apresentada nas validações anteriores, pois, tal como nas restantes matrizes, a concentrações mais baixas as interferências do método tornam-se mais relevantes dificultando a medição exata da concentração de acrilamida no alimento em questão. Todavia, a este nível de concentração não existe um conflito de interesse dos resultados, pela mesma razão apresentada na determinação da linearidade das matrizes bolachas/cereais e batatas fritas.

Para as restantes concentrações da gama da curva de calibração a diferença entre o valor prático e estimado do pico cromatográfico é aceite pelo critério de validação, pois todos os resíduos estimados encontram-se abaixo do valor definido.

Tabela 4.36 - Determinação da gama de linearidade através da análise dos resíduos para a matriz pão, por extração convencional por solventes.

Concentração (ng/mL)	Área do Pico	Área do pico estimada	Resíduo	Critério de Aceitação (<10%)
2	4711	7093,454811	33,59%	NO
10	29346	31076,75949	5,57%	YES
25	75957	76045,45576	0,12%	YES
50	158004	150993,2829	-4,64%	YES
75	227755	225941,11	-0,80%	YES
100	296266	300888,9371	1,54%	YES

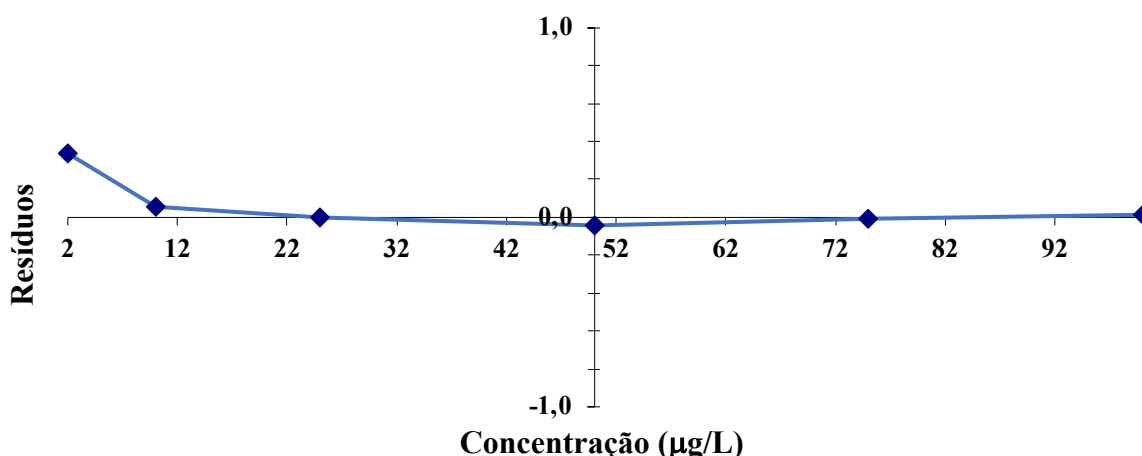


Figura 4.14 - Gráfico da análise de resíduos referente à matriz pão, por extração convencional por solventes.

4.3.3. Repetibilidade

A repetibilidade para a matriz pão foi estimada por 10 ensaios independentes ao nível mais baixo e mais alto da curva de calibração, 2 ng/mL e 100 ng/mL, representada na tabela 4.37.

Pelo cálculo da média, variância e desvio padrão da área do pico cromatográfico, tempo de retenção e razão iónica é possível estimar o limite de repetibilidade para cada um dos parâmetros do aparelho cromatográfico e verificar que as amostras se encontram em condições de repetibilidade.

O coeficiente de variação calculado para cada um dos parâmetros supramencionados para as concentrações estipuladas encontram-se todos abaixo do limite máximo de 10%, logo pode-se concluir que para a extração em fase sólida desta matriz é válida nas condições de repetibilidade.

Tabela 4.37 - Repetibilidade ao nível do PC1 e do PC2 da curva de calibração, com o respetivo coeficiente de variação para a matriz pão, com extração por solventes.

2 ng/mL (PC1)			100 ng/mL (PC2)		
Área do Pico	Tempo de Retenção	Razão Iónica	Área do Pico	Tempo de Retenção	Razão Iónica
5144	1,648	5,20%	286457	1,648	3,80%
5324	1,654	4,80%	285234	1,651	3,60%
5805	1,645	4,70%	278459	1,645	3,60%
5623	1,646	5,30%	279896	1,639	3,60%
6231	1,629	5,70%	274099	1,647	3,80%
5968	1,638	5,30%	287169	1,644	3,50%
5288	1,63	4,90%	291356	1,634	3,90%
6817	1,632	5,40%	289455	1,645	3,60%
6352	1,632	4,70%	282342	1,647	3,80%
6498	1,64	5,70%	284937	1,645	3,70%

Média	5905	1,6394	5,17%	283940,4	1,6445	3,69%
Variância	320038	7,4489E-05	0,0014%	27848515,2	2,3167E-05	0,0002%
Desvio Padrão	565,719012	0,00863069	0,38%	5277,16924	0,00481318	0,13%
Limite de repetibilidade (r)	1584,01323	0,02416594	0,01064573	14776,0739	0,01347689	0,00360272
CVr (%)	9,58%	0,53%	7,35%	1,86%	0,29%	3,49%
Critério de Aceitação	YES	YES	YES	YES	YES	YES

O teste da homogeneidade de variâncias foi aplicado para verificar se a gama de trabalho estava bem ajustada a esta extração convencional para a matriz pão, onde se pode concluir que efetivamente está bem ajustada visto que o valor teste, 5,33, se encontra abaixo do valor tabelado, 5,35, da distribuição F de *Snedecor / Fisher* para uma confiança de 99%, como se pode observar na tabela 4.38.

Tabela 4.38 - Homogeneidade de variâncias para a determinação da gama de trabalho, relativamente aos resultados de repetibilidade com a extração convencional por solventes na matriz pão.

	2 ng/mL	100 ng/mL
n	10	10
n-1	9	9
Média (yn)	5905	283040,4
Desvio padrão (yn)	565,72	3014,44
Desvio padrão relativo (yn)	9,58%	1,07%
Variância (Sn)	3,20E+05	9,09E+06
PG	5,33	
F (n1-1, n10-1, 99,0 %) =	5,35	
Critério de Aceitação: SIM		

4.3.4. Precisão Intermédia

Para o cálculo da precisão intermédia para a matriz pão foram efetuadas três medições, em condições de repetibilidade, para amostras fortificadas a 20 µg/kg e 40 µg/kg. O parâmetro que variou para o cálculo da precisão intermédia foram os dias das análises, tendo as amostras sido analisadas em três dias diferentes, obtendo-se um total de nove resultados ao longo dos três dias.

Ao nível de concentração de fortificada de 20 µg/kg foi obtido em formato de desvio para a precisão intermédia um valor de 2,1775, percentualmente de 10,37%, e um coeficiente de variação de 9,70%. A precisão intermédia em valor de percentagem encontra-se ligeiramente acima do valor desejável, 10%, visto que a esta concentração existiram algumas amostras fortificadas que apresentaram uma concentração inferior à desejada, no entanto, não tem grande relevância nos resultados finais, podendo ser validada a variabilidade dos resultados intralaboratoriais. Para um nível de concentração de 40 µg/kg alcançou-se uma precisão intermédia de 2,5013, em percentagem de 5,76%, e um coeficiente de variação de 5,39%.

Tabela 4.39 - Precisão Intermédia para a extração por solventes na matriz pão, fortificada a 20 µg/kg.

Data	[Fortificada] teórica (µg/kg)	[Fortificada] prática (µg/kg)	Média (N=9)	Desvio Padrão (N=9)	Precisão Intermédia (N=9)	Precisão Intermédia (%) (N=9)	Coefficiente de Variação (%) (N=9)
06/09/2021	20	17,64	20,99	2,0368	2,1775	10,37%	9,70%
		19,36					
		19,51					
15/09/2021	20	20,76					
		20,39					
		21,59					
28/09/2021	20	23,01					
		24,15					
		22,49					

Tabela 4.40 - Precisão Intermédia para a extração por solventes na matriz pão, fortificada a 40 µg/kg.

Data	[Fortificada] teórica (µg/kg)	[Fortificada] prática (µg/kg)	Média (N=9)	Desvio Padrão (N=9)	Precisão Intermédia (N=9)	Precisão Intermédia (%) (N=9)	Coefficiente de Variação (%) (N=9)
06/09/2021	40	45,55	43,44	2,3398	2,5013	5,76%	5,39%
		39,61					
		41,57					
15/09/2021	40	45,06					
		40,95					
		42,75					
28/09/2021	40	44,24					
		44,71					
		46,54					

4.3.5. Limites Analíticos

Em concordância com os parâmetros de linearidade associados à curva de calibração da matriz pão, obteve-se os limites analíticos correspondentes através das equações 2.5 e 2.6, que se encontram representados na tabela 4.41.

O limite de deteção obtido é de 5,00 µg/kg e o limite de quantificação é de 15,15µg/kg, que apesar de se encontrar acima do padrão de menor concentração da gama de trabalho, como nas matrizes anteriormente analisadas, não interfere de modo significativo nos resultados intralaboratoriais, podendo, assim, assumir-se estes limites analíticos válidos.

Tabela 4.41 - Limites analíticos para a extração convencional por solventes na matriz pão.

Declive (b)	4529,32
Ordenada na origem (a)	-7551,48
Coefficiente de correlação (R)	0,998614
Coefficiente de determinação (R²)	0,997231
Sensibilidade (e)	4529,32
Desvio padrão residual da reta (Sy/x)	10275,28
Limite de Deteção (L.D.)	5,00
Limite de Quantificação (L.Q.)	15,15

4.3.6. Efeito Matriz

Por último, o efeito matriz do alimento pão para a extração convencional por solventes com as soluções *Carrez* foi calculado através das respostas obtidas da reta em matriz e da reta em solvente, injetadas nas mesmas condições das matrizes anteriores, e com a utilização da solução aquosa de ácido fórmico para a reta em solvente.

Tabela 4.42 - Efeito matriz para a extração convencional com as soluções *Carrez* na matriz pão

Concentração (ng/mL)	Área do pico da amostra com adição de padrão	Área do pico da solução com o analito em solvente	Efeito Matriz (%)
2	4553	4711	3,47%
10	30240	29346	-2,96%
25	72531	75957	4,72%
50	159022	158004	-0,64%
75	229700	227755	-0,85%
100	294161	296266	0,72%

4.3.7. Cromatograma

Os picos cromatográficos da acrilamida representativos da matriz pão, para uma amostra real e respectiva fortificada, encontram-se nas figuras 4.15 e 4.16.

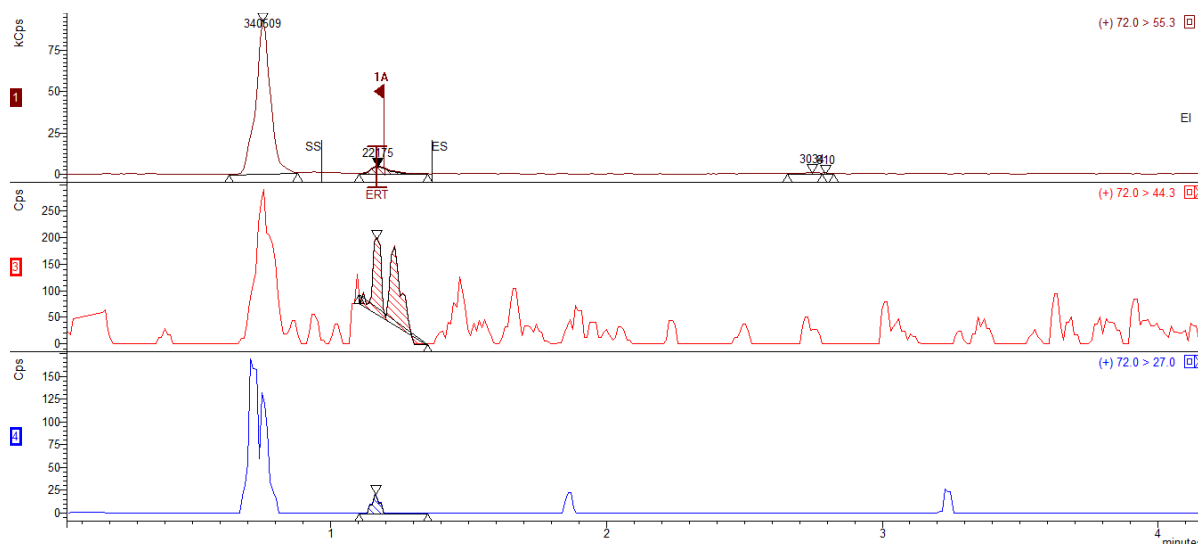


Figura 4.15 - Cromatograma de uma amostra representativa da matriz pão para a extração convencional com as soluções *Carrez*.

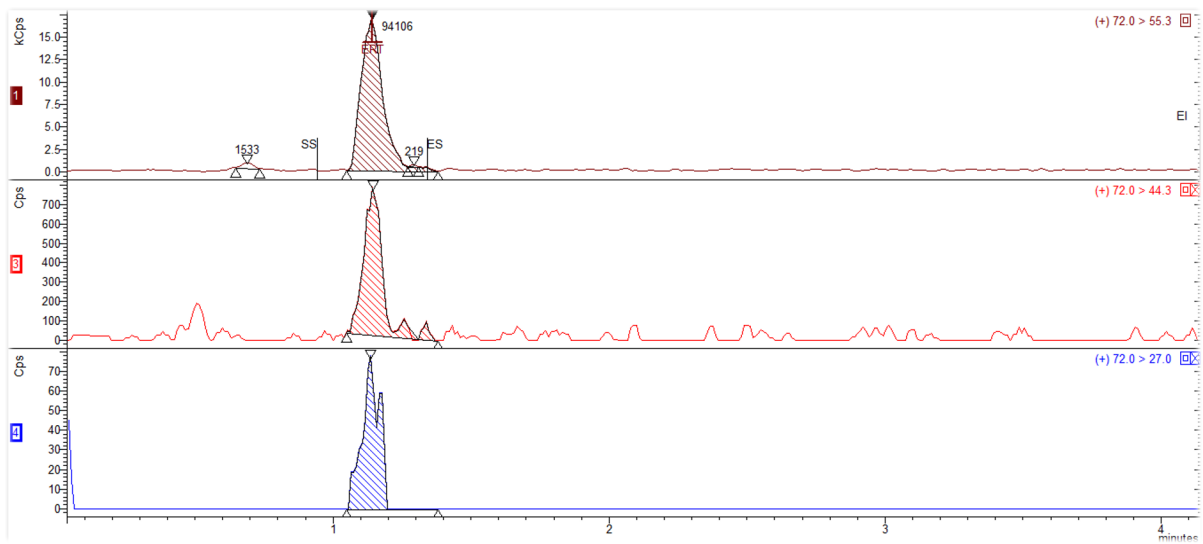


Figura 4.16 - Cromatograma de uma amostra fortificada representativa da matriz pão para a extração convencional com as soluções Carrez.

Conclusões e Propostas de trabalho futuro

O principal objetivo deste trabalho é a implementação e validação do método analítico para a quantificação dos níveis de acrilamida em alimentos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (UPLC-MS/MS), com ionização por *electrospray*. nas matrizes pão, cereais/bolachas e batatas na rotina diária do laboratório da SGS.

A extração convencional por solventes, com as soluções Carrez e a solução aquosa de ácido acético, apresentou resultados válidos para as matrizes pão e bolachas/cereais, não sendo aplicável às batatas fritas. A extração em fase sólida foi implementada no laboratório para a análise de batatas fritas, e, posteriormente, sentiu-se a necessidade de aplicar o método extrativo a amostras de bolachas/cereais, para ambas as matrizes os resultados obtidos estão de acordo com os critérios definidos.

Para a matriz bolachas e cereais obteve-se, no estudo da especificidade e seletividade, uma média das taxas de recuperação, para a extração convencional por solventes, de 103,27% com fortificadas a 20 µg/kg e de 94,26% com fortificadas de 40 µg/kg, e, para a extração em fase sólida, uma média das taxas de recuperação de 109,65% com fortificadas a 20 µg/kg. As curvas de calibração para esta matriz, construídas pelos dois métodos de extração, apresentam uma boa linearidade visto que o coeficiente médio de variação de cada uma delas é inferior a 10%. Verificou-se, também, que os resultados obtidos se encontram em condições de repetibilidade e de precisão intermédia aquando da avaliação da precisão dos métodos aplicados, e que a gama de trabalho está bem ajustada. Os limites analíticos práticos obtidos para a extração convencional por solventes para a matriz cereais/bolachas foram 3,43 µg/kg, correspondente ao limite de deteção, e 10,40 µg/kg, para o limite de quantificação, para a extração em fase sólida o limite de deteção obtido foi 7,49 µg/kg e o limite de quantificação de 22,69 µg/kg.

A acrilamida foi extraída da matriz batatas fritas apenas pela extração em fase sólida, onde se obteve uma média das taxas de recuperação, no primeiro nível de fortificação, de 94,04% e, no segundo nível de fortificação, de 105,19%. A curva de calibração das batatas fritas atingiu bons resultados de linearidade, onde se obteve um coeficiente médio de variação de 1,32%, abaixo do valor de referência de 10%, e conclui-se que a gama de trabalho está bem ajustada. De modo a verificar a precisão dos resultados laboratoriais avaliou-se a repetibilidade e precisão intermédia dos mesmos, onde se concluiu a validação dos mesmos. O limite de deteção atingido pelo método foi de 1,62 µg/kg e o limite de quantificação de 4,92 µg/kg.

Por fim, a matriz pão foi validada para a extração convencional por solventes, com a solução aquosa de ácido acético e das soluções Carrez, onde na avaliação das amostras fortificadas a 20 µg/kg se obteve uma média das taxas de recuperação de 99,25% e nas amostras fortificadas a 40 µg/kg uma média de 102,94%. Em relação à curva de calibração, o coeficiente médio de variação obtido foi de 0,40%, verificando assim a linearidade da mesma. Os resultados obtidos encontram-se em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, e a gama de trabalho está bem ajustada pelo cálculo do valor teste. Os limites analíticos atingidos para

este método de extração foram de 5,00 µg/kg e de 15,15 µg/kg, para o limite de detecção e de quantificação, respetivamente.

As amostras reais que foram sendo analisadas ao longo do estágio da dissertação enquadraram-se nos métodos de extrações validados, verificando-se um melhoramento do pico cromatográfico e uma otimização dos resultados em relação ao método anteriormente utilizado no laboratório.

Em suma, a validação dos métodos extrativos para as matrizes analisadas através do UPLC-MS/MS foi bem-sucedida porque apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros em estudo. Como perspetiva futura, a avaliação da reprodutibilidade e da robustez poderia ser aprofundada de modo a que o método seja validado em condições interlaboratoriais e seja efetuada uma avaliação mais detalhada da robustez do mesmo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Journal of the National Cancer Institute, “Acrylamide and Cancer: Tunnel Leak in Sweden Prompted Studies,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 94, p. 876–878, Junho 2002.
- [2] U. Angberg, “Constructing the complicated Hallandsås Tunnel,” *Global Railway review*, 18 Setembro 2014. [Online]. Available: <https://www.globalrailwayreview.com/article/21524/\constructing-the-complicated-hallandsas-tunnel/>. [Acedido em 16 Maio 2021].
- [3] Jornal Oficial da União Europeia , “REGULAMENTO (CE) Nº 852/2004 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 29 de Abril de 2004,” 30 Abril 2004. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:pt:PDF>. [Acedido em 8 Setembro 2021].
- [4] Jornal Oficial da União Europeia, “REGULAMENTO (UE) 2017/2158 DA COMISSÃO de 20 de novembro de 2017 que estabelece medidas de mitigação e níveis de referência para a redução da presença de acrilamida em géneros alimentícios,” 21 Novembro 2017. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R2158&from=PT>. [Acedido em 12 Março 2021].
- [5] O. Kaplan, G. Kaya , M. Ince e M. Yaman, “Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry,” *Microchemical Journal*, vol. 93, pp. 173-179, 2009.
- [6] S. Jesus, I. Delgado, A. Rego, C. Brandao, R. Galhano dos Santos , J. Bordado, Isabel Castanheira, J. Bordado e I. Castanheira, “Determination of Acrylamide in Portuguese Bread by UPLC-MS/MS: Metrological and Chemometric tools,” *Acta imeko*, Vols. %1 de %2Volume 7, Número 2, pp. 96-101, Junho 2018.
- [7] Société Générale de Surveillance (SGS), “História do Grupo SGS - Liderança e Inovação desde 1878,” 1 Janeiro 2021. [Online]. Available: <https://www.sgs.pt/-/media/global/documents/brochures/sgs-group-history-pt.pdf>. [Acedido em 18 Abril 2021].
- [8] Société Générale de Surveillance (SGS), “A SGS DE FORMA RESUMIDA,” SGS, 1 Janeiro 2021. [Online]. Available: <https://www.sgs.pt/pt-pt/our-company/about-sgs/sgs-in-brief>. [Acedido em 17 Abril 2021].
- [9] Société Générale de Surveillance (SGS), “SGS EM PORTUGAL,” [Online]. Available: <https://www.sgs.pt/pt-pt/our-company/about-sgs/sgs-in-brief/sgs-in-portugal>. [Acedido em 2021 Maio 6].
- [10] SGS, “Acrilamida em Alimentos,” 4 Abril 2018. [Online]. Available: <https://www.sgs.pt/pt-pt/news/2018/04/acrilamida-em-alimentos>. [Acedido em 2021 Maio 6].
- [11] J. Rodrigues, “Acrilamida - Molécula da Semana,” *fciência*, 25 Abril 2013. [Online]. Available: <https://www.fciencias.com/2013/04/25/acrilamida-molecula-da-semana/>. [Acedido em 12 Março 2021].
- [12] 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 e 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.
- [13] Y. Zhang, “Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge.,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Vols. %1 de %247, no 5, pp. 521-542, 2007.
- [14] J. Keramat, A. LeBail, C. Prost e M. Jafari, “Acrylamide in Baking Products: A Review Article,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 4, pp. 530-543, 2011.
- [15] P. Rydberg, S. Eriksson, E. Tareke, P. Karlsson, L. Ehrenberg e M. Tornqvist, “Investigations of Factors That Influence the Acrylamide Content of Heated Foodstuffs,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, pp. 7012-7018, 2003.
- [16] B. Kettlitz, L. P. Robin, M. W. Pariza, J. Coughlin e C. Davies, “Acrylamide in Food,” *Science Direct*, 2002.
- [17] S. Mil-Homens, “HACCP,” Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - ASAE, Fevereiro 2007. [Online]. Available: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp.aspx>. [Acedido em Setembro 2021].
- [18] Comissão Europeia, “REGULAMENTO (UE) 2017/2158 DA COMISSÃO, de 20 de novembro de 2017, que estabelece medidas de mitigação e níveis de referência para a redução da presença de acrilamida em géneros alimentícios,” *Jornal Oficial da União Europeia*, pp. 24/304 - 44/304, 2017.
- [19] J. Rodrigues, “Acrilamida - Molécula da Semana,” *fCiências*, 25 Abril 2013. [Online]. Available: <https://www.fciencias.com/2013/04/25/acrilamida-molecula-da-semana/>. [Acedido em Setembro 2021].
- [20] International Agency for Research on Cancer, “Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for IARC,” em *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon, França, Abril 2014.
- [21] C. M. D. Soares, “Determinação dos teores de acrilamida em alimentos,” Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 2006.
- [22] Wikipédia, a enciclopédia livre, “Cromatografia,” Wikipedia, 1 Junho 2021. [Online]. Available: https://pt.wikipedia.org/wiki/Cromatografia#Teoria_da_cromatografia. [Acedido em Março 2021].
- [23] Wikipédia, a enciclopédia livre, “Cromatografia líquida de alta eficiência,” 4 Março 2021. [Online]. Available: https://pt.wikipedia.org/wiki/Cromatografia_l%C3%ADquida_de_alta_efici%C3%A2ncia. [Acedido em Abril 2021].
- [24] Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos, “Processos de Separação - Cromatografia - FUNDAMENTOS,” [Online]. Available: <http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=451>. [Acedido em Abril 2021].
- [25] M. Rodriguez-Aller, R. Robert Gurny, J.-L. Veuthey e D. Guillarme, “Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications,” *Journal of chromatography A*, vol. 1292, pp. 2-18, 2013.
- [26] Y. Jin, X. Xue, H. Shi, Y. Xiao, F. Zhang e X. Liang, “HPLC and UPLC Switch for TCM analysis,” *Mode Tradit Chin Med*, vol. 10 (I), pp. 80-84, 2008.
- [27] Bruker, “LC-MS: Elute LC series,” Bruker, 2021. [Online]. Available: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/lc-ms/elute.html>. [Acedido em Maio 2021].

- [28] Waters, "HPLC: High Performance Liquid Chromatography," Waters, [Online]. Available: http://www.waters.com/waters/en_US/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography/nav.htm?cid=10048919&locale=en_US. [Acedido em Maio 2021].
- [29] Portal da Engenharia Química, "Processos de separação: cromatografia," Portal da Engenharia Química, [Online]. Available: http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=103&Itemid=451. [Acedido em Maio 2021].
- [30] J. Ali, S. Linke e L. Pereira, "Robust Separation of Polar Compounds Utilising Porous Graphitic Carbon (PGC) - Chromatography today," 6 Junho 2013. [Online]. Available: https://www.chromatographytoday.com/article/electrophoretic-separations/35/jamil_ali1_simon_linke2_luisa_pereira3/robust_separation_of_polar_compounds_utilising_porous_graphitic_carbon_pgc/1432. [Acedido em Abril 2021].
- [31] Thermo Fisher Scientific, "Colunas Hypercarb HPLC e UHPLC," Thermo Fisher Scientific, [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/chromatography/liquid-chromatography-lc/hplc-uhplc-columns/hypercarb-hplc-uhplc-columns.html>. [Acedido em Abril 2021].
- [32] O. V. Bustillos, "A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem HPLC-MS/MS," *Analytica*, 2020. [Online]. Available: <https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-liquida-acoplada-a-espectrometria-de-massas-em-tandem-hplc-ms-ms/>. [Acedido em Maio 2021].
- [33] Wikipédia, a enciclopédia livre, "Espectrometria de massa," Wikipédia, a enciclopédia livre, 13 Janeiro 2021. [Online]. Available: https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectrometria_de_massa#Estrutura_de_um_espectr%C3%B4metro_de_mmassas. [Acedido em Maio 2021].
- [34] Wikipédia, a enciclopédia livre, "Espectrometria de massa em tandem," Wikipédia, 16 Junho 2015. [Online]. Available: https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectrometria_de_massa_em_tandem. [Acedido em Maio 2021].
- [35] A. R. Fernandes, "Identificação e caracterização por espectrometria de massa com ionização por electrospray de antimaláricos que atuam na cadeia mitocondrial de transporte de eletrões," Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.
- [36] I. C. S. F. Jardim, "Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas," em *Preparo de Amostra*, 13083-970 Campinas, Scientia Chromatographica Vol.2, N°1, 2010, pp. 13-25.
- [37] Waters, "SPE Method Development," Waters - The Science Of What's Possible, [Online]. Available: https://www.waters.com/waters/en_US/SPE-Method-Development/nav.htm?cid=10083845&locale=en_US. [Acedido em Maio 2021].
- [38] M. S. Young, "Solid-Phase Extraction with Oasis HLB Sorbent: Simple Procedures for Superior Sample Preparation," [Online]. Available: https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/my_oas98.pdf. [Acedido em Maio 2021].
- [39] Sigma Aldrich, "Guide to Solid Phase Extraction," 1998. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>. [Acedido em Março 2021].
- [40] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária, "Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica," Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

- [41] Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal - Relacre, Guia Relacre 13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química, Espaço 2 Gráfico: Relacre, Fevereiro 2000.
- [42] A. F. S. Martins, "Implementação e validação de métodos analíticos," Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.
- [43] P. J. Taylor, "Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry," *Clinical Biochemistry*, pp. 328-334, Abril 2005.
- [44] P. Panuwet, R. E. Hunter Jr., P. E. D'Souza, X. Chen, S. A. Radford, M. E. Marder, J. R. Cohen, K. Karta, P. Barry Ryan e D. Boyd Barr, "Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 93-105, 2016.
- [45] A. Jozinovic, B. Sarkanj, D. Ackar, J. Panak Balentic, D. Subaric, T. Cvet, J. Ranilovic, S. Guberac e J. Babic, "Simultaneous determination of acrylamide and hydroxymethylfurfural in extruded products by LC-MS/MS Method," *Journal Molecules - Molecular Diversity Preservation International (MDPI)*, pp. 1-13, 2019.
- [46] F. Khoshnam, B. Zargar, N. Pourreza e H. Parham, "Acetone extraction and HPLC determination of acrylamide in potato chips," *Journal of the Iranian Chemical Society*, Vols. %1 de %2Vol. 7, No. 4, pp. 853-858, 2009.
- [47] D. Kafouris, G. Stavroulakis, M. Christofidou, X. Lakovou, E. Christ, L. Paikousis, M. Christodoulidou e E. Loannou-Kakouri, "Determination of acrylamide in food using a UPLC-MS/MS method: results of the official control and dietary exposure assessment in Cyprus," 27 Agosto 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1508893>.
- [48] Gökmen, H. Z. Senyuva e Vural, "Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting," 20 Fevereiro 2007. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1080/02652030500109834>.
- [49] Y. Zhang, J. Jiao, Z. Cai, Y. Zhang e Y. Ren, "An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1142, pp. 194-198, 2007.
- [50] O. Kaplan, G. Kaya, C. Ozcan, M. Ince e M. Yaman, "Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry," *Microchemical Journal*, vol. 93, pp. 173-179, 2009.
- [51] E. Tareke, P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson e M. Tornqvist, "Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vols. %1 de %2Vol. 50, No. 17, p. 4998–5006, 2002.
- [52] S. Jesus, I. Delgado, A. Rego, C. Brandao, R. Galhano dos Santos, J. Bordardo e I. Castanheira, "Determination of Acrylamide in Portuguese Bread by UPLC-MS/MS: Metrological and Chemometric tools," *Acta IMEKO*, Vols. %1 de %2Vol. 7, No. 2, Artº. 17, pp. 96-101, Junho 2018.
- [53] K. J. McHale, W. Winnik e G. Paul, "Quantitation of Acrylamide in Food Samples on the TSQ Quantum Discovery by LC-APCI-MS/MS," *Thermo Fisher Scientific*, pp. 20-22, 2009.
- [54] J. Liu, G. Zhao, Y. Yuan, F. Chen e X. Hu, "Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 108, p. 760–767, 2008.

- [55] C. Tae Kim, E.-S. Hwang e H. Joo Lee, "An improved LC-MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed foods," *Food Chemistry*, vol. 101, p. 401–409, 2007.
- [56] E. Bermudo, E. Moyano, L. Puignou e M. T. Galceran, "Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products," *Talanta*, vol. 76, p. 389–394, 2008.
- [57] V. Gokmen, H. Z. Senyuvab, J. Acara e K. Sarioglu, "Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1088, pp. 193-199, 2005.
- [58] C. Douny, J. Widart, G. Maghuin-Rogist, E. De Pauw e M.-L. Scippo, "Quantification of acrylamide in various belgian potato products using solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry detection," *Food and Public Health*, pp. 137-141, 2012.
- [59] Escola Superior de Biotecnologia - Universidade Católica Portuguesa, "ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica," Órgão de polícia criminal, Janeiro 2005. [Online]. Available: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/acrilamidas.aspx>. [Acedido em 12 Março 2021].

ANEXO A- Limites Analíticos e Taxas de Recuperação de acordo com a literatura

Nas tabelas A.1. e A.2. são apresentados os limites analíticos e as taxas de recuperação referentes aos catorze artigos analisados da literatura.

Tabela A.1. - Dados correspondentes aos limites analíticos dos catorze artigos estudados

Referência	Nº	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
[45]	1	0,62	1,89
[46]	2	2,46	3,14
[47]	3	10	32
[48]	4	2	10
[49]	5	1	3
[50]	6	0,5	5
[51]	7	10	-
[52]	8	-	-
[53]	9	-	0,25
[54]	10	1	5
[55]	11	0,1	2
[56]	12	2	6
[57]	13	2	4
[58]	14	25	50

Tabela A.2. – Dados correspondentes às taxas de Recuperação dos catorze artigos estudados

Referência	Nº	Taxa de Recuperação (%)
[45]	1	91,4
[46]	2	98,01
[47]	3	98,9
[48]	4	98,8
[49]	5	81,6
[50]	6	90
[51]	7	112
[52]	8	95
[53]	9	-
[54]	10	76
[55]	11	99,3
[56]	12	-
[57]	13	96,2
[58]	14	-

ANEXO B – Especificação Técnica de Serviço da Determinação de Acrilamida |



Especificação Técnica de Serviço Determinação de Acrilamida por LC-MS/MS em Alimentos

Impressos/Documents	Metodologia	Avisos e Precauções de segurança/ Particularidades
<p>Olcay K., Gokce K., Cemile O., Muharrem I., Mehmet Y., Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry, Microchemical Journal 93 (2009) 173-179.</p> <p>Rafaela Martin, Bruker Daltonik Applications Quadrupole MS, Bremen, Germany (2018). Quantitation of Antidepressants in Serum by UHPLC-Triple Quadrupole Mass Spectrometry. Acedido a 3 de Abril de 2021. https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/triple-quads/evoc-lc.1_page_1.html.</p> <p>Susana J., Inês D., Andreia R., Carlos B., Rui Galhano dos Santos, João B., Isabel C., Determination of Acrylamide in Portuguese Bread by UPLC-MS/MS: Metrological and Chemometric tools, Acta IMEKO, vol. 7, no. 2, article 17, June 2018.</p> <p>Reg. (EU) Nº 2158 (2017).</p> <p>SANTE/11813/2017 – Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, Novembro, 2017.</p>	<p>PROCEDIMENTO</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pesar cerca de 1g±0,01g da amostra para um tubo de centrifuga de 50mL; - Adicionar 100µL das soluções Carrez I e Carrez II a cada amostra; - Adicionar 9,8mL de uma solução aquosa de ácido acético de concentração 0,2mM; - Agitar no agitador rotativo <i>MultiReax</i> durante 5 minutos; - Centrifugar as amostras por 10 min a 5000rpm; - Se o sobrenadante ficar com muitas partículas em suspensão, filtrar o mesmo com um filtro de seringa de 0,45 µm; - Transferir a amostra para um <i>vial</i> para ser analisado no UPLC-MS/MS. <p>Para amostras com alto teor de gordura ou que a matriz contenha mais interferentes, é necessário realizar a fase de extração por <i>SPE</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pesar cerca de 2g±0,01g da amostra para um tubo de centrifuga de 50mL; - Adicionar 20mL da solução aquosa de ácido fórmico (0,1%); 	<p>Usar luvas no manuseamento de todos os reagentes, principalmente nos padrões de contaminantes, de modo a não haver contaminações diretas no operador nem contaminações cruzadas. O mesmo princípio aplica-se ao manuseamento de amostras.</p> <p>Consultar as fichas de segurança das soluções padrão de pesticidas, outros padrões e de solventes onde se encontram as medidas corretas de ação.</p> <p>Sempre que uma amostra esteja superior ao limite de lei, critério definido pelo cliente, ou houver um resultado suspeito, a amostra deve ser repetida com uma nova toma da amostra. Se os resultados não forem concordantes, dever-se-á reanalisar a amostra, se possível com nova trituração, de forma a garantir uma maior homogeneidade da mesma.</p> <p>Sempre que o controlo de qualidade (padrões, recuperadas, etc.) não cumprem os critérios definidos, o RT deverá ser alertado de modo a tomar as ações adequadas. Desde que justificado devidamente, poder-se-á aceitar os resultados das amostras do <i>batch</i> analisado.</p>

Especificação Técnica de Serviço

Determinação de Acrilamida por LC-MS/MS em Alimentos

Equipamento/Material		Condições Cromatográficas																												
<p>Reagentes/Soluções:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Água Ultrapura (HPLC) e MiliQ; - Metanol LC-MS (pureza ≥ 99,9%); - Ácido Acético Glacial (pureza 99,9%); - Ácido Fórmico (pureza ≥ 98%); - Carrez I (ferracianeto de potássio); - Carrez II (sulfato de zinco). <p>Equipamento/Material:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Balança Analítica (0,1 mg); - Agitador Rotativo <i>MultiReax</i>; - Centrífuga; - Seringas Descartáveis; - Filtros de 0,45 µm; - Micropipeta (10 µl, 100 µl, 1000 µl); - Manifold SPE e bomba a vácuo; - Cartuchos OASIS HLB; - LC-MS/MS (especificações); - Coluna cromatográfica (Hypercarb 5 µm, 100 x 2,1 mm). 	<ul style="list-style-type: none"> - Agitar no agitador rotativo <i>MultiReax</i> durante 10 minutos; - Centrifugar as amostras por 10 min a 5000rpm; - Os cartuchos Oasis HLB foram condicionados com 3,5 mL de metanol e equilibrados com 3,5 mL da solução aquosa de ácido fórmico (0,1%); - Foi carregado 1,5 mL do sobrenadante e o analito foi eluído com 3mL da solução aquosa de ácido fórmico (0,1%) para um balão de 10 mL, tendo o volume sido perfazido com a solução aquosa de ácido fórmico; - Se as amostras apresentarem partículas suspensas, filtrar o sobrenadante com um filtro de seringa de 0,45 mm; - Transferir a amostra para um frasco pequeno para ser analisado no UPLC-MS/MS. <div style="text-align: center;"> <p>(A) (B) (C) (D)</p> <p>Condicionamento Passagem da amostra Lavagem Eluição</p> </div>	<p>- LC</p> <p>Temperatura da coluna: 60°C</p> <p>Fase Móvel: Água Ultra-Pura (A) e Metanol (B) (Ver informação complementar)</p> <p>Volume de injeção: 25 µL</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr style="background-color: #f4a460;"> <th>Tempo (min)</th> <th>Fluxo (mL/min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0,5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>3,0</td> <td>0,5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>4,0</td> <td>0,5</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>6,0</td> <td>0,5</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>6,10</td> <td>0,5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>7,5</td> <td>0,5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table> <p>- MS/MS</p> <p>Técnica de ionização: ESI</p> <p>Modo de aquisição MRM (as transições para cada composto podem ser consultadas na versão em vigor do método de aquisição);</p>	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	A (%)	B (%)	0	0,5	95	5	3,0	0,5	95	5	4,0	0,5	2	98	6,0	0,5	2	98	6,10	0,5	95	5	7,5	0,5	95	5
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	A (%)	B (%)																											
0	0,5	95	5																											
3,0	0,5	95	5																											
4,0	0,5	2	98																											
6,0	0,5	2	98																											
6,10	0,5	95	5																											
7,5	0,5	95	5																											



Especificação Técnica de Serviço

Determinação de Acrilamida por LC-MS/MS em Alimentos

Particularidades	Controlo de Qualidade	
<p>- Quantificação de amostras:</p> <ul style="list-style-type: none">As amostras deverão ser quantificadas em retas da mesma matriz que a amostra a ser analisada.Se a amostra for quantificável/detetável e a recuperada não cumprir os critérios na reta em matriz igual à amostra, deverá-se quantificar a amostra pelo método de adição padrão.Independentemente da forma de quantificação, se a concentração da amostra for superior à gama de trabalho, deverá-se diluir a amostra em matriz adequada, de forma a quantificar a mesma na reta de calibração.Poder-se-á recorrer à quantificação a <i>single-level</i> para uma determinação mais exata. esta quantificação deve ser o mais correta possível.Sempre que justificável deverá-se corrigir o resultado à recuperação. <p>Limites de quantificação e analitos:</p> <p>Acrilamida: 20 µg/Kg (Carrez)</p> <p>10 µg/Kg (SPE)</p>	<p>Análise de Brancos – Será efetuada uma corrida em branco de solvente diariamente.</p> <p>Análise de Brancos de Extração – Deverá ser efetuada uma análise de brancos da extração diariamente.</p> <p>Análise de Duplicados – Fazer uma amostra em duplicado por cada lote de amostras. A amostra duplicada poderá ser uma fortificada.</p> <p>Ensaio de Recuperação – Fazer um ensaio de recuperação por cada matriz diferente no lote de amostras (preferencialmente e sempre que possível sobre uma amostra do mesmo tipo sem analitos nativos).</p> <p>Para amostras com probabilidade elevada de ter acrilamida (batatas fritas, bolachas de arroz, bolachas de milho, etc.) se a amostra for utilizada para fazer o controlo de qualidade deverá-se fortificar a um nível mais alto que o LQ.</p> <p>Reta de calibração – Fazer uma reta de calibração diariamente (sempre que necessário). Preparar a reta e padrões de controlo como descrito na informação complementar ou respetiva folha de cálculo.</p> <p>Adicionalmente, poder-se-á quantificar a amostra através do método de adição padrão.</p>	<p>Os seguintes parâmetros foram mantidos constantes durante toda a aquisição:</p> <ul style="list-style-type: none">- Temperatura do cone: 350°C- Fluxo do gás do cone: 20 psi- Temperatura da sonda: 400°C- Fluxo do gás da sonda: 50 psi- Fluxo do gás nebulizador: 50 psi- Modo gás de exaustão: On- IS (polaridade negativa): 4500 V- IS (polaridade positiva): 3000 V



Especificação Técnica de Serviço
Determinação de Acrilamida por LC-MS/MS em Alimentos

Padrões: - Padrão de acrilamida da marca Dr. Ehrenstorfer, solução com concentração de 1000 mg/mL diluída em Metanol;	Sempre que necessário, dever-se-á corrigir o resultado à recuperação para obter um resultado mais correto e exato. Controlo de qualidade – Os resultados destes controlos serão registados na respetiva folha de controlo de qualidade. Padrões de controlo – Deverá em cada corrida analisar 1 ou 2 pontos de controlo (inicial e final da gama de trabalho) de uma reta de calibração preparados separadamente da reta de calibração.	
Objetivo / Campo de Aplicação	Expressão de resultados	
Determinação de acrilamida pelos métodos de extração de fase sólida (SPE) e pelas soluções Carrez em géneros alimentícios, por cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de massa (Triplo Quad LC-MS/MS).	Cálculos: A concentração obtida na análise deve ser multiplicada pelo respetivo fator do método, consoante o método utilizado para a extração. Os cálculos são efetuados automaticamente na respetiva folha de controlo de qualidade ou FCM. Expressão dos resultados: µg/Kg Para o cliente expressa-se em µg/Kg O número de algarismos significativos deve estar de acordo com a incerteza do método Fator do Método: 10	



Especificação Técnica de Serviço

Determinação de Acrilamida por LC-MS/MS em Alimentos

Informação Complementar

Fase móvel LC-MS/MS:

Fase A – Água ultrapura + 0,1% de ácido fórmico – para 1L de água ultrapura dissolver 1000 µL de ácido fórmico.

Fase B – Metanol LC-MS + 0,1% de ácido fórmico – para 1L de metanol dissolver 1000 µL de ácido fórmico.

Solução stock de Acrilamida (1000ppm): Pesar 0,01g do padrão de acrilamida e dissolver em 20mL de água. A solução deve ser armazenada a 4°C. A solução deve ser preparada, corrigindo à surpresa.

Solução de trabalho (1) de Acrilamida em água (10ppm): Para um vial de 2mL adicionar 990 µL de água. Adicionar 10 µL da solução de acrilamida a 1000ppm (solução stock). Agitar vigorosamente. Poder-se-á dimensionar a solução segundo o volume que se for utilizar. Preparar sempre que se for efetuar o método de ensaio.

Solução de trabalho (2) de Acrilamida em água (1ppm): Para um vial de 2mL adicionar 900 µL de água. Adicionar 100 µL da solução de acrilamida a 10ppm (solução de trabalho (1)). Agitar vigorosamente. Poder-se-á dimensionar a solução segundo o volume que se for utilizar. Preparar sempre que se for efetuar o método de ensaio.

Solução de trabalho (3) de Acrilamida em água (0,1ppm): Para um vial de 2mL adicionar 900 µL de água. Adicionar 100 µL da solução de acrilamida a 1ppm (solução de trabalho (2)). Agitar vigorosamente. Poder-se-á dimensionar a solução segundo o volume que se for utilizar. Preparar sempre que se for efetuar o método de ensaio.

Reta de Calibração: Preparar as soluções padrão no próprio dia de análise.

2 ng/mL: Pipetar 20 µL solução de trabalho (3) + 980 µL de matriz – **PC1**

5 ng/mL: Pipetar 50 µL solução de trabalho (3) + 950 µL de matriz

10 ng/mL: Pipetar 100 µL solução de trabalho (3) + 900 µL de matriz

25 ng/mL: Pipetar 25 µL solução de trabalho (2) + 975 µL de matriz

50 ng/mL: Pipetar 50 µL solução de trabalho (2) + 950 µL de matriz

75 ng/mL: Pipetar 75 µL solução de trabalho (2) + 925 µL de matriz

100 ng/mL: Pipetar 100 µL solução de trabalho (2) + 900 µL de matriz – **PC2**

Ensaio de Recuperação

1. Pesará 1g de amostra. Alíquotará 20 mL da solução de trabalho (2). Agitar vigorosamente no agitador rotativo *Multireax* durante 1 minuto. Fortificada a 20 µg/Kg.
2. Pesará 1g de amostra. Alíquotará 100 mL da solução de trabalho (2). Agitar vigorosamente no agitador rotativo *Multireax* durante 1 minuto. Fortificada a 100 µg/Kg.

Preparação das soluções de extração

1. **Solução aquosa de ácido acético (0,2 mM):** Diluir 2 µL de ácido acético glacial, com pureza de 99,9%, em 200 mL de água;
2. **Solução aquosa de ácido fórmico (0,1%):** Diluir 100 µL de ácido fórmico, com pureza de 98%, em 100 mL de água;
3. **Carrez I:** Dissolver 15g de ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) em 100mL de água;
4. **Carrez II:** Dissolver 30g sulfato de zinco ($ZnSO_4$) em 100 mL de água.



2021

MARIANA CORREIA COSTA
MARIANA CORREIA COSTA

Determinação dos Teores de Acrilamida em alimentos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência