



Marta Filipa Felício Fidalgo Menana

Licenciatura em Engenharia Alimentar

**Implementação e validação do método
de quantificação de Ácido Propiónico
por HPLC em produtos de padaria e
pastelaria**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro
Durão Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL.

Co-orientador: Dr^a. Sandra Lampreia Silva, Responsável
Técnica, SGS Portugal.

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto Motta
Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



Setembro de 2017



**Implementação e validação do método de quantificação de Ácido
Propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria**



Marta Filipa Felício Fidalgo Menana

Licenciatura em Engenharia Alimentar

**Implementação e validação do método
de quantificação de Ácido Propiónico
por HPLC em produtos de padaria e
pastelaria**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro
Durão Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL.
Co-orientador: Dr^a. Sandra Lampreia Silva, Responsável
Técnica, SGS Portugal.

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto Motta
Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão

“Implementação e validação do método de quantificação do ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria”

Copyright © 2017 de Marta Filipa Felício Fidalgo Menana, Faculdade de Ciências e Tecnologias, 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.”

Agradecimentos

Este trabalho é o reflexo de sete meses de aprendizagem, dedicação e partilha que, no fim, resulta na despedida da vida académica e no abraçar novos desafios. Muitos foram aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para que este objetivo fosse alcançado.

Antes de mais quero agradecer à Sociedade Geral de Superintendência, S.A. (SGS) pela disponibilização de todas as condições essenciais para a realização da presente dissertação. Agradeço à Eng^a. Ana Machado pelo privilégio de ingressar numa empresa de elevado prestígio.

À Professora Ana Lúcia Leitão por ter aceite entrar comigo nesta “aventura” e ter aceite ser minha orientadora partilhando, assim, comigo conhecimento e experiência científica ao longo de todo o percurso da realização desta dissertação assim como ao longo de todo este percurso académico.

À D^a. Sandra Silva, responsável técnica pelo Laboratório de Química da SGS, o meu sincero agradecimento pela forma como me acolheu, apoio, simpatia e pela partilha de conhecimentos que me transmitiu durante o período de estágio.

A toda a equipa do laboratório de química pela amizade e simpatia. Em especial às analísta Sara Círiaco, pela ajuda e explicação, à analísta Lurdes Alcantara pela boa disposição, disponibilidade em ajudar e ensinar, e embora mais no fim do estágio, não posso deixar de agradecer à analísta Ana Rita Boledo pela ajuda e ensinamentos dados, pois, embora tenha sido pouco tempo foram uma mais valia para conhecer melhor o equipamento.

Aos meus colegas de curso e também estagiários no laboratório de química Diana Ferreira e Pedro Pires pelo apoio e suporte neste período.

A todos os meus amigos pelo companheirismo e apoio ao longo da realização deste trabalho.

Ao meu namorado Gonçalo Mendes pela amizade, amor, compreensão, incentivo e paciência, agradeço com um carinho muito especial, pois foram fundamentais para na motivação para o desenvolvimento deste trabalho.

Por último, e como os últimos são os primeiros, um agradecimento muito especial aos meus pais. Obrigada por tudo o que fizeram por mim pelo apoio, carinho, força, incentivo e amor demonstrados nos momentos mais difíceis e que foram fundamentais para a realização deste trabalho e por me acompanharem nas várias etapas da minha vida. Agradeço também a toda a minha família, tios, primos e avós pelo companheirismo e amor transmitidos em toda a minha vida.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

Resumo

O pão é uma das formas mais comuns do consumo de cereais, encontrando-se presente nos hábitos alimentares da população Portuguesa. De forma a prolongar o seu tempo de prateleira torna-se necessário a introdução de aditivos ao seu processamento, sendo o principal o ácido propiónico. Este composto não apresenta risco para a saúde do consumidor aquando adicionado dentro dos limites legislados tornando-se, assim, importante e necessário o controlo dos seus níveis nos alimentos. Deste modo, de forma a monitorizar os níveis de ácido propiónico nos géneros alimentícios, o presente trabalho teve como objetivo a implementação e validação de uma metodologia analítica para a determinação de ácido propiónico em amostras de pão e bolo de arroz por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), no laboratório de Química da SGS Portugal. De forma a assegurar a integridade dos resultados analíticos obtidos foram avaliados parâmetros de validação como a linearidade, os limites de deteção e quantificação, a repetibilidade, a precisão intermédia e a exatidão. Os resultados mostram que o método é linear para uma gama de trabalho entre 25,0 e 400,0 mg/kg de ácido propiónico. O método permite detetar o analito a partir 2,7 mg/L e quantificá-lo a partir de 8,2 mg/L. O método de HPLC apresentou repetibilidade e precisão intermédia aceitáveis, uma vez que os respetivos coeficientes de variação foram inferiores a 5%. A exatidão do método foi determinada recorrendo a ensaios de recuperação, tendo-se obtido percentagens de recuperação entre 83 – 108%. Tendo em conta que estes parâmetros se encontram de acordo com os critérios estabelecidos para a validação de um método analítico, considera-se que o objetivo proposto foi cumprido.

Palavras-chave: Ácido propiónico, Aditivo, HPLC, Validação, Implementação, Produtos de pastelaria e padaria

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

Abstract

Bread is one of the most common forms of cereal consumption, being present in eating habits of the Portuguese population. In order to prolong its shelf life it is necessary to introduce additives, with propionic acid being generally the main one. This compound poses no health risk to consumers when added within the legislated limits. Thus, is important to monitor the levels of propionic acid in foodstuffs. The present work had as its main objective the implementation and validation of an analytical methodology for the determination of propionic acid in samples of bread and rice cake by high performance liquid chromatography (HPLC) in the Chemistry laboratory of SGS Portugal. In order to ensure the integrity of the analytical results obtained, validation parameters such as linearity, detection and quantification limits, repeatability, intermediate accuracy and accuracy were evaluated. The results show that the method is linear for a working range of 25.0 to 400.0 mg/kg of propionic acid. The method allows to detect the analyte from 2.7 mg/L and quantifies it from 8.2 mg/L. The HPLC method showed acceptable repeatability and intermediate accuracy, since the respective coefficients of variation were less than 5%. The accuracy of the method was checked using recovery experiments, being the yielding recovery percentages between 83 - 108%. Taking into account that these parameters meet the criteria established for the validation of an analytical method, it is considered that the objective has been achieved.

Keywords: Propionic acid, Additive, HPLC, Validation, Implementation, Bakery and confectionery products

Índice de matérias

| | |
|---|----|
| 1. Enquadramento teórico | 1 |
| 1.1. Importância do tema..... | 1 |
| 1.2. Objetivos..... | 2 |
| 1.3. Estrutura | 2 |
| 2. Caracterização da empresa | 5 |
| 2.1 A empresa | 5 |
| 2.2 História | 6 |
| 2.3 Competências | 7 |
| 2.4. Laboratório SGS..... | 8 |
| 3. Aditivos | 9 |
| 3.1. Aditivos na área da panificação | 10 |
| 3.2. Ácido propiónico..... | 11 |
| 3.2.1. Produção do ácido propiónico por processos fermentativos | 13 |
| 3.2.2. Toxicidade do ácido propiónico..... | 15 |
| 3.2.3. Legislação | 16 |
| 4. Métodos de determinação do ácido propiónico..... | 19 |
| 4.1. Métodos cromatográficos | 20 |
| 4.2. Método colorimétrico | 20 |
| 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | 23 |
| 5.1. História | 23 |
| 5.2. Conceitos e parâmetros operatórios | 24 |
| 5.3. Aplicação | 26 |
| 5.4. O sistema de HPLC..... | 26 |
| 5.4.1. Bomba | 27 |
| 5.4.2. Injetor..... | 28 |
| 5.4.3. Pré-coluna | 29 |
| 5.4.4. Coluna cromatográfica | 30 |
| 5.4.5. Detetores | 31 |

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

| | |
|--|----|
| 5.4.6. Processador de dados | 33 |
| 5.5. Possíveis problemas e limitações | 33 |
| 6. Validação de métodos analíticos | 34 |
| 6.1. Curva de calibração | 36 |
| 6.1.1 Gama de trabalho..... | 37 |
| 6.1.2. Linearidade..... | 38 |
| 6.2. Limites analíticos | 39 |
| 6.2.1. Limite de deteção | 39 |
| 6.2.2. Limite de quantificação..... | 40 |
| 6.3. Sensibilidade | 40 |
| 6.4. Precisão..... | 41 |
| 6.4.1. Repetibilidade..... | 41 |
| 6.4.2. Reprodutibilidade | 42 |
| 6.4.3. Precisão intermédia..... | 42 |
| 6.5. Exatidão..... | 43 |
| 7. Metodologia Experimental..... | 45 |
| 7.1. Amostras | 45 |
| 7.1.1. Amostras para validação do método..... | 47 |
| 7.1.2. Recolha de amostras no mercado | 47 |
| 7.2. Reagentes e preparação de soluções | 46 |
| 7.3. Método a validar | 47 |
| 7.3.1. Padaria e Pastelaria | 47 |
| 7.3.2. Condições cromatográficas..... | 48 |
| 7.3.3. Quantificação de ácido propiónico por HPLC..... | 49 |
| 8. Resultados e Discussão..... | 51 |
| 8.1. Curva de calibração | 51 |
| 8.1.1. Gama de trabalho..... | 51 |
| 8.1.2. Linearidade..... | 54 |
| 8.2. Limiares analíticos..... | 55 |
| 8.3. Precisão..... | 56 |
| 8.3.1. Repetibilidade..... | 56 |

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

| | |
|---|----|
| 8.3.2. Precisão intermédia..... | 58 |
| 8.4. Exatidão..... | 60 |
| 8.5. Resultado das amostras recolhidas no mercado | 64 |
| 9. Conclusão..... | 67 |
| Referências bibliográficas | 69 |

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 - Logótipo do grupo SGS | 5 |
| Figura 2.2 - Sede atual da SGS Lisboa, onde se encontram escritórios e a SGS Multilab..... | 6 |
| Figura 2.3 - Logótipo da SGS Multilab. | 8 |
| Figura 3.1 - Grupos de aditivos alimentares existentes..... | 10 |
| Figura 3.2 - Formula estrutural do ácido propiónico. | 11 |
| Figura 3.3 - Análise por microscopia electrónica de uma bactéria do género <i>Propionibacterium</i> (Adaptado de Rabah e Carmo, 2017)..... | 14 |
| Figura 5.1 - Representação de um cromatograma (Adaptado de Scott, 2003)..... | 24 |
| Figura 5.2 - Principais componentes do HPLC (Adaptado de Gratzfeld-Hüsgen, 2001)..... | 27 |
| Figura 5.3 - Representação de injetor de 6 válvulas (Adaptado de Argenton, 2010)..... | 29 |
| Figura 5.4 - Propriedades físico-químicas da amostra (Adaptado de Chust, 1990)..... | 30 |
| Figura 7.1 - Solução padrão (P1 – P5) e seus respetivos vails. | 47 |
| Figura 7.2 - Operação de centrifugação das amostras numa centrífuga HERMLE..... | 48 |
| Figura 7.3 - Sobrenadante resultante do processo de centrifugação (A) Sobrenadante do pão; (B) Sobrenadante do bolo. | 48 |
| Figura 8.1 - Curva de calibração do ácido propiónico na gama de concentrações de 25,0 a 400,0 mg/L..... | 51 |
| Figura 8.2 - Cromatograma correspondente ao padrão 25,0 mg/L. | 52 |
| Figura 8.3 - Cromatograma correspondente ao padrão 400,0 mg/L. | 53 |
| Figura 8.4 - Teste de RIKILT para avaliação a linearidade do método. | 55 |
| Figura 8.5 - Cromatograma referente à amostra de pão não fortificada..... | 60 |
| Figura 8.6 - Cromatograma referente à amostra de pão fortificada com 1 mL de stock de ácido propiónico. | 61 |
| Figura 8.7 - Cromatograma referente à amostra de bolo não fortificada..... | 62 |
| Figura 8.8 - Cromatograma referente à amostra de bolo fortificada com 1 mL de stock de ácido propiónico. | 62 |
| Figura 8.9 - Cromatograma referente à amostra A | 64 |
| Figura 8.10 - Cromatograma referente à amostra B. | 65 |
| Figura 8.11 - Cromatograma referente à amostra C | 65 |

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1 - Principais propriedades do ácido propiónico. | 12 |
| Tabela 3.2 - Teores máximos (mg/kg) de ácido propiónico - propionatos estabelecidos pela Uniao Europeia para os diferentes produtos alimentares (Regulamento (CE) n.º 1333/2008)... | 18 |
| Tabela 7.1 - Diferentes amostras estudadas. | 45 |
| Tabela 7.2 - Curva de calibração. | 46 |
| Tabela 7.3 - Condições cromatográficas. | 49 |
| Tabela 8.1 - Padrões das curvas de calibração e seus respectivos sinais cromatográficos referentes ao dia 1 e 2. | 51 |
| Tabela 8.2 - Áreas dos picos, média, desvio padrão e variâncias dos padrões 25,0 e 400,0 mg/L..... | 53 |
| Tabela 8.3 - Análise da adequação ao sistema cromatográfico para primeiro padrão (25,0 mg/L). | 54 |
| Tabela 8.4 - Cálculo dos resíduos para o estudo da linearidade..... | 55 |
| Tabela 8.5 - Valor do limite de deteção calculado para a determinação do ácido propiónico. ... | 56 |
| Tabela 8.6 - Avaliação da repetibilidade obtidos para pão de forma. | 57 |
| Tabela 8.7 - Avaliação da repetibilidade obtidos para o bolo de arroz. | 57 |
| Tabela 8.8 - Avaliação da precisão intermédia para as matrizes em estudo em dias diferentes. | 59 |
| Tabela 8.9 - Análise da exatidão para ambas as amostras. | 63 |
| Tabela 8.10 - Análise da concentração do analíto em estudo das amostras recolhidas no mercado..... | 66 |

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

BPF, Boas Práticas de Fabrico

C₃H₆O₂, Ácido propiónico

CE, Cromatografia de extrusão

CV, Coeficiente de variação

FDA, *Food and Drugs Administration*

FDL, Fluorescência

FID, Detetor de ionização de chama

GC, Cromatografia gasosa

Gc –MS, Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

GFC, Cromatografia de filtração em gel

GPC, Cromatografia de permeação em gel

GRAS, *Generally Recognized As Safe*

HPLC, Cromatografia líquida de alta eficiência

H₂SO₄, Ácido sulfúrico

IDA, Ingestão Diária Recomendada

IJES, *International Journal of Engineering And Science*

IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LD, Limite de deteção

LQ, Limite de quantificação

MS, Espectrometria de massa

Na₂SO₄, Sulfato de sódio

OMS, Organização Mundial de Saúde

ppm, partes por milhão

SGS, *Société Générale de Surveillance*

UE, União Europeia

UV, Ultravioleta

UV – Vis, Ultravioleta - Visível

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

1. Enquadramento teórico

1.1. Importância do tema

Sendo uma das formas mais antigas e comuns da ingestão de cereais e sendo considerado um alimento funcional numa alimentação saudável, completa e equilibrada, o pão integra-se nos hábitos alimentares da população em geral e Portuguesa em particular, sendo o sector de padaria/pastelaria um dos mais importantes do nosso país. A perda de “frescura” deste tipo de produtos pode dever-se a uma série de fatores como a perda de água ou até mesmo devido a deterioração microbiana (Guynot *et al.*, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 20% dos alimentos produzidos deixam de estar aptos para consumo devido à sua deterioração. Muitas substâncias são incorporadas nos alimentos com um propósito funcional, no entanto quando em alimentos processados, esses agentes químicos passam a ser chamados de aditivos alimentares (Brito, 2011; Fennema, 2010).

Os aditivos alimentares são aprovados para um número de usos diferentes. Alguns melhoram o valor nutricional de certos alimentos, enquanto outros são usados para tornar os alimentos mais atraentes, melhorando o seu sabor, textura, consistência ou cor. Os conservantes químicos com propriedades antimicrobianas desempenham um importante papel na prevenção da degradação e na garantia de segurança de muitos alimentos. No entanto, a escolha adequada de um conservante deve ser feita com base em alguns fatores, tais como o tipo de microrganismo a ser inibido, a facilidade de manuseio, o impacto no paladar, o custo e a sua eficácia (Brito, 2011; Faraji *et al.*, 2016; Fennema, 2010).

O ácido propiónico e os seus sais de sódio e cálcio exercem atividade antimicrobiana contra fungos e algumas bactérias (Fennema 2010). Estes seus sais, considerados também como conservantes, encontram-se na categoria dos aditivos seguros reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*). De entre os alimentos onde são permitidos estes conservantes encontram-se: pão, biscoitos, bolos, doces e outros produtos de farinha. Contudo, estes sais de ácido propiónico podem constituir um problema para os indivíduos que sofrem de acidemia propiónica. Por esta razão, torna-se necessário saber as quantidades máximas permitidas, de acordo com os regulamentos em vigor na Europa, para o uso destes conservantes nos diferentes produtos, de modo a garantir a segurança alimentar e a saúde do consumidor (Faraji *et al.*, 2016; Azzam *et al.*, 2010).

O método de HPLC é um método analítico que tem como objetivo separar as espécies químicas presentes numa determinada amostra consoante as suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, sendo deste modo um método que pode ser utilizado para separar, identificar e quantificar substâncias presentes em diferentes tipos de produtos através

das áreas de picos que vão corresponder a cada um dos componentes da amostra (Chust, 1990).

1.2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho consistiram na implementação e validação de uma metodologia experimental para a determinação do ácido propiónico em produtos de padaria e pastelaria, assim como a análise de ácido propiónico em amostras de pão de forma fatiado embalado comercializadas no mercado Português através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência ou HPLC no Laboratório de Química da SGS. Para tal, vários parâmetros experimentais que influenciavam o desempenho da extração do ácido propiónico foram investigados e otimizados.

1.3. Estrutura

No capítulo 1 é feito um enquadramento inicial do trabalho, assim como a sua estrutura e os objetivos do mesmo.

No capítulo 2 é feita uma breve descrição da empresa onde foi desenvolvida a componente prática da dissertação. É realizada a caracterização da empresa onde se incluem os seus valores, visão, missão e os sectores em que atua, e a sua história com ênfase na história da SGS em Portugal.

No capítulo 3 é feita uma referência aos aditivos alimentares, aos efeitos do ácido propiónico na saúde humana, porque é usado na área alimentar, principalmente em produtos de padaria e pastelaria. Também são mencionados os limites máximos legislados para os vários produtos alimentares.

No capítulo 4 são apresentados vários métodos analíticos usados na determinação e quantificação do ácido propiónico.

No capítulo 5 é feita uma explicação de todo o funcionamento do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), uma vez que no presente trabalho é aplicado o método de HPLC para a quantificação do ácido propiónico.

No capítulo 6 são explicados os parâmetros mínimos necessários que devem ser avaliados para se poder realizar o processo de validação de um método analítico.

No capítulo 7, referente à metodologia experimental, são descritas as amostras, os reagentes, os materiais e equipamentos utilizados, assim como todo o processo experimental que foi posteriormente validado.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

No capítulo 8 estão apresentados os resultados obtidos e a discussão dos mesmos.

O capítulo 9, correspondente à conclusão do trabalho, são apresentados resumidamente os pontos fundamentais da presente dissertação e perspectivas futuras.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

2. Caracterização da empresa

2.1 A empresa

O grupo SGS (*Société Générale de Surveillance*) (Figura 2.1) é conhecido mundialmente devido aos serviços prestados nas áreas de inspeção, verificação, testes e certificação, sendo também, reconhecido como referência mundial em qualidade e integridade. Os valores pelos quais se regem são a paixão, a integridade, o espírito empreendedor e a inovação. De modo a garantir estes valores a cada serviço prestado, surgiu a *SGS academy* dando aos colaboradores do grupo e a outras empresas uma formação eficaz e de alta qualidade de modo a dar a conhecer à equipa práticas mais modernas da indústria, o acompanhamento das mudanças nos padrões técnicos e o cumprimento dos requisitos regulatórios e legais (SGS, 2014).



Figura 2.1- Logótipo do grupo SGS.

A rede mundial de escritórios e laboratórios da SGS possui mais de 1.350 instalações, sendo a colaboração entre afiliadas um dos factores decisivos para a qualidade dos serviços prestados pelo grupo aos seus clientes, analisando e testando as amostras de acordo com a legislação em vigor ou mediante os requisitos especificados pelo cliente. A SGS organiza os laboratórios por centros de competências regionais conseguindo uma cobertura multidisciplinar e mundial para qualquer tipo de produto desde alimentares, cosméticos, químicos e petroquímicos, gases, materiais de construção, máquinas, vestuário e têxteis-lar, cerâmicas, brinquedos, eletrodomésticos e outros aparelhos eletrónicos, surgindo assim, por uma questão de maior eficiência na gestão da qualidade da empresa, a SGS Multilab composto pelo Laboratório de Análises Físico-Químicas, Microbiológicas e Amostragem, Laboratório de Ensaios de Ambiente e Segurança, Laboratório de OGC (*oil, gas and chemical*) e Laboratório de Ensaios Não Destrutivos (SGS, 2012; SGS, 2014).

Englobada neste grupo, encontra-se a SGS Portugal sediada no Polo Tecnológico de Lisboa (Figura 2.2) e apresenta uma rede de laboratórios em Lisboa, Trafaria e Sines e uma rede de escritórios de norte a sul do país, como também nos arquipélagos da Madeira e Açores.



Figura 2.2 - Sede atual da SGS Lisboa, onde se encontram escritórios e a SGS Multilab.

2.2 História

A empresa surgiu no ano de 1878 em Rouen, França, após Henri Goldstück verificar que os exportadores de grão a granel estavam a perder dinheiro por não terem um representante. A sua ideia, foi defender os direitos do exportador, inspecionando e verificando a qualidade e quantidade de grão à chegada com o importador. O negócio foi crescendo e juntamente com um amigo, Johann A. Haisen formaram a SGS sob o nome de Goldstück e Haisen & C^a. Ao fim do primeiro ano a empresa já tinha aberto escritórios em três dos maiores portos de França (Gomes, 2012).

A inovação desta empresa fez com que crescesse exponencialmente tornando-se líder do negócio de inspeção de grão. Em 1913 inspecionava 21 milhões de toneladas de grão por ano e contava já com uma rede de 45 escritórios na Europa (Gomes, 2012; SGS, 2014).

Em 1919, a sede da empresa passou de Paris para Genebra, Suíça, devido à II Guerra Mundial e mudou o seu nome para Société Générale de Surveillance, nome que até hoje ostenta. Já em 1928 o grupo SGS cresceu internacionalmente com oficiais e afiliadas em 21 países por todo o mundo (SGS, 2012; SGS, 2014).

O início da SGS em Portugal data de 1922, sendo representada pela empresa Garland Laidley, referência na logística da navegação, sendo responsável pela carga e descarga de todos os navios. A expansão do negócio em território Português deu-se em 1939, com a inspeção e análise de matérias-primas, minerais e metais através da aquisição de laboratórios na Europa (SGS, 2014).

No final da década de 60 a SGS iniciou a supervisão de produtos petroquímicos, o que levou a empresa em Portugal a ter a sua própria identidade deixando de ser uma simples representação de Genebra. Com o decorrer dos anos foram-se realizando contratos governamentais que permitiram o crescimento da empresa passando, esta, não só a atuar na área da inspeção como também na produção de produtos têxteis e agroalimentares (SGS, 2012).

Na década de 80, a SGS expande-se em Portugal, abrindo uma filial no Porto e deixa de ser representada pela Garland. Esta expansão deveu-se ao acordo de inspeção pré-embarque de importações angolanas, que na sua maioria eram expedidas a partir do porto de Leixões. A importância da indústria têxtil no norte levou à abertura de um laboratório, sendo este o primeiro laboratório têxtil em Portugal a ter implementado o Sistema de Gestão de Qualidade. Também em Lisboa, no final da década de 80, foi aberto um laboratório agroalimentar tornando-se em 1992 o primeiro laboratório privado deste sector a ser acreditado (SGS, 2012; SGS, 2014).

Actualmente, a SGS atua numa grande variedade de sectores industriais, empregando mais de 80.000 pessoas em todos os seus escritórios e laboratórios existentes em vários países do mundo. O Grupo tem se expandido de modo a se tornar o líder da indústria, resultado da melhoria contínua da inovação, da redução de riscos, da produtividade e da eficiência das suas operações (SGS, 2014).

2.3 Competências

As competências abrangidas pela SGS são: formações, certificações e auditorias, análises e ensaios, segurança alimentar, controlo de qualidade, avaliação de aspetos ambientais, avaliação de riscos de saúde e segurança, inspeção industrial, peritagem e avaliação do setor automobilístico. Por outro lado, os benefícios oferecidos pela SGS em todos os setores são: segurança, qualidade, confiança, sustentabilidade, produtividade, redução de riscos e rapidez (SGS, 2014; SGS, 2016).

No setor agroalimentar, a SGS atua com base no princípio “do prado ao prato” com qualidade e segurança, atuando na área da pesca e agricultura com análises de produção de produtos, monitorização e certificação, na área da indústria alimentar atua com análises microbiológicas, físico-químicas, nutricionais, sensoriais e de biologia molecular, na área do acompanhamento do produto atua com auditorias de segurança alimentar, certificação de produtos, inspeções na produção, no transporte com supervisão de cargas e descargas, já na área do retalho e restauração atua com análises de qualidade, auditorias, apoio técnico e certificação (SGS, 2014; SGS, 2016).

2.4. Laboratório SGS

O laboratório agroalimentar da SGS Lisboa, também conhecido como MultiLab (Figura 2.3), foi fundado em 1988 com o objetivo de fornecer um suporte ao controlo de operações de cereais. Daí em diante, começaram a ser realizadas análises de química clássica, sendo que nos dias de hoje é muito prestigiado no mercado (SGS, 2014).

Hoje em dia, este laboratório atua em diversas áreas com uma equipa altamente especializada. Possui acreditação na área agroalimentar, de detergentes, cosméticos, produtos de higiene, dispositivos médicos, segurança ocupacional e ambiental e, por fim, em ensaios não destrutivos (Gomes, 2013; SGS, 2016).



Figura 2.3 - Logótipo da SGS Multilab.

3. Aditivos

As necessidades atuais, como a produção a larga escala, a exigência de qualidade por parte dos consumidores e a necessidade de aumentar o tempo de vida de prateleira dos alimentos, conduziu ao recurso a aditivos alimentares (Marquito, 2014). Os aditivos alimentares são definidos como substâncias adicionadas aos alimentos com o propósito de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais. São essenciais para que os consumidores possam ingerir produtos industrializados e conservados a longo prazo. Esta manipulação pode ser feita durante o processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento (Sousa, 2012).

De acordo com a legislação vigente, o Regulamento (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro entende-se por aditivo alimentar “qualquer substância não consumida habitualmente como género alimentício em si mesma e habitualmente não utilizada como ingrediente característico dos géneros alimentícios, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos géneros alimentícios, com um objetivo tecnológico na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem directa ou indirectamente um componente desses géneros alimentícios”.

Do ponto de vista legislativo, cada aditivo alimentar deve fornecer alguma função ou atributo útil ou aceitável para justificar o seu uso. Contudo, o uso destas substâncias para ocultar danos ou alterações nos alimentos, bem como iludir os consumidores é expressamente proibido pelas legislações que regem o uso de aditivos em alimentos (Fennema, 2010).

Alguns aditivos têm a função de manter a consistência do produto, outros têm a função de manter ou melhorar o valor nutricional de certos alimentos, enquanto outros são usados para tornar os alimentos mais atraentes, melhorando o seu sabor, textura, consistência ou cor (Faraji *et al.*, 2016). Na Figura 3.1 está representado um esquema dos aditivos existentes.

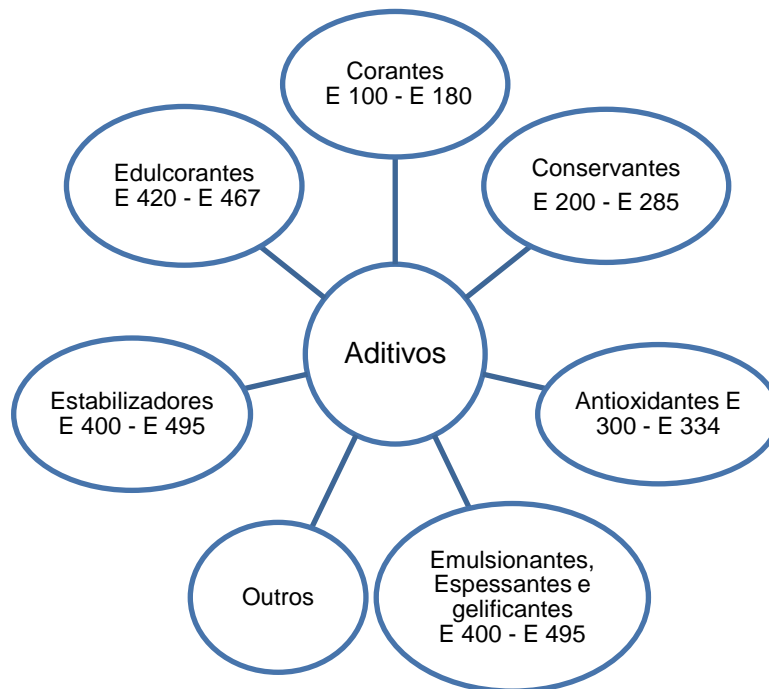


Figura 3.1 – Grupos de aditivos alimentares existentes.

3.1. Aditivos na área da panificação

Os aditivos alimentares, geralmente, mais utilizados em panificação, com o intuito de facilitar o processo de panificação e permitindo a obtenção de produtos mais atrativos tanto a nível visual como, a nível de textura e de durabilidade e com melhores características organolépticas são os emulsionantes, antioxidantes, estabilizadores, reguladores de acidez e os conservantes (Marquito, 2014; Sousa, 2012).

Entende-se por:

- Emulsionantes: Substância que torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento. São responsáveis por um série de benefícios, que vão desde a maior facilidade de manipulação das massas até ao incremento no volume e vida útil dos produtos finais (Sousa, 2012; Vasconcelos e Filho, 2010).

- Antioxidantes: A atividade antioxidante é a capacidade de um composto inibir a degradação oxidativa. Os antioxidantes podem ser sintéticos, usados como aditivo alimentar para prevenir ou retardar a oxidação lipídica, ou antioxidantes naturais, como o tocoferol (vitamina E) que previne a oxidação dos ácidos gordos insaturados (Honorato *et al.*, 2013). São compostos que atuam diretamente sobre a estrutura das proteínas do glúten, reforçando a sua rede. Como consequência direta da ação dos agentes antioxidantes sobre o glúten, observa-se um aumento da capacidade de retenção do CO₂ (Sousa, 2012).

- Estabilizadores: Substâncias que evitam que com o tempo os ingredientes se separem em diferentes fases, onde atuam promovendo uma interação homogênea de ingredientes. Assim, define-se estabilizante como uma substância que favorece e mantém as características físicas de uma emulsão e suspensão (Honorato *et al.*, 2013).
- Reguladores de acidez: Substâncias que alteram ou controlam a acidez ou alcalinidade dos alimentos (Vasconcelos e Filho, 2010).
- Conservantes: Substâncias que adicionadas a um determinado alimento, impedem ou retardam alterações provocadas pela ação de microrganismos, enzimas e/ou agentes físicos. São utilizadas diversas classes de conservantes, dependendo do produto alimentar e do microrganismo que poderá estar presente (Honorato *et al.*, 2013 ; Nollet, 2000).

Tendo em conta que no presente trabalho é estudado um grupo de conservantes específico, e no sentido de aprofundar o conhecimento do conceito deste tipo de aditivo, de acordo com a legislação vigente, o Regulamento (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro entende-se por conservantes: “substâncias que prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos e/ou contra o desenvolvimento de microrganismos patogénicos”.

3.2. Ácido propiónico

O ácido propiónico é caracterizado por ser um líquido incolor, oleoso e com odor forte. É um ácido orgânico monocarboxílico saturado de cadeia aberta, com três átomos de carbono, conhecido na nomenclatura IUPAC como ácido propanóico, a sua fórmula química é $C_3H_6O_2$ (Figura 3.2). É polar e pode formar pontes de hidrogénio, é um ácido solúvel em água e álcool e ioniza-se parcialmente em solução aquosa. Como outros ácido carboxílicos antimicrobianos, a forma não dissociada deste ácido é ativa, sendo que o intervalo de efetividade se estende até pH 5,0. O seu nome vem do grego *protos* – primeiro e *pion* – gordura, isto porque este é o menor ácido que possui propriedades de ácidos gordos. Quando separado em meio aquoso, apresenta uma formação de uma camada oleosa superficial. Pode ser convertido em sais de cálcio, sódio, potássio e amónia, sendo que este último não é autorizado na União Europeia como aditivo alimentar (EFSA, 2011; Castro, 2014; Ngome, 2013). Na tabela 3.1 são apresentadas de forma resumida as principais características do ácido propiónico.

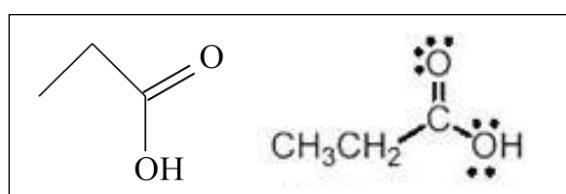


Figura 3.2 - Formula estrutural do ácido propiónico.

Tabela 3.1 - Principais propriedades do ácido propiónico.

| Propriedades | Valores |
|-------------------|-------------------------|
| Massa molar | 74,08 g/mol |
| Ponto de fusão | -21 °C |
| Ponto de ebulição | 141 °C |
| Densidade | 0,992 g/cm ³ |
| Viscosidade | 10 mPa.s |
| pKa | 4,8 |

De entre as suas mais variadas aplicações, destaca-se o seu papel como conservante na indústria alimentar devido principalmente à atividade antimicrobiana contra fungos e outros microrganismos. O ácido propiónico é um ácido orgânico fraco que exerce atividade antimicrobiana através de alterações do gradiente de pH da membrana. Moléculas de ácido propiónico não dissociadas conseguem atravessar a membrana plasmática e dissociam-se no citosol, onde o pH é mais alcalino que no ambiente extracelular. Para a manutenção da homeostasia celular, H⁺ - ATPase transportam ativamente prótons para fora da célula, levando a uma diminuição da energia disponível para as demais atividades metabólicas (Melo, 2007). Na indústria alimentar o ácido propiónico (E 280) e os seus sais de sódio (E 281), cálcio (E 282) e potássio (E 283) são usados como conservantes na área da panificação, em queijos e em rações animais. Estes sais são considerados como seguros (GRAS) de acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*). Os sais de propionato de cálcio ou de sódio correspondem a 45% e 21% respetivamente, do mercado de ácido propiónico (Castro, 2014; Boyaval, 1995).

O propionato de cálcio (E 282) é um conservante usado no pão, pois para além de retardar o crescimento de microrganismos, evita o amarelecimento e a viscosidade das suas massas, mantendo-o fresco. Por esta razão, embora o propionato de cálcio e de sódio sejam agentes antimicrobianos igualmente eficazes, o propionato de cálcio é a forma comumente usada em todo o mundo como um conservante na produção de pão (Ngome, 2013; Faraji *et al.*, 2016; Brito, 2011).

O ácido propiónico tem tido um uso extensivo no campo da panificação, devido à inibição efetiva de fungos filamentosos, à atividade contra o organismo *Bacillus mesentericus* que causa viscosidade no pão, mas também devido à sua pouca ação contra os fermentos biológicos (Brito, 2011 ; Fennema, 2010).

Este composto ocorre endogenamente como um subproduto do metabolismo humano, sendo gerado durante a oxidação de ácidos gordos com número de carbonos ímpares e pelo catabolismo de alguns aminoácidos. Assim, o ácido propiónico e os seus sais são metabolizados eficientemente no organismo ao entrar em caminhos metabólicos diferentes, principalmente as vias de ácido gordo e ácido tricarboxílico (EFSA, 2011).

O ácido propiónico é, então, um componente normal do metabolismo humano, ocorre naturalmente em animais e em produtos lácteos como o queijo suíço, que pode conter até 1% de ácido propiónico. Por outro lado, o soro fermentado por *Propionibacterium freundenreichii*, substituindo os conservantes químicos, tem-se comportado como agente fungistático natural quando incorporado em pães e outros produtos de pastelaria (Ngome, 2013).

Este composto é produzido principalmente pela fermentação de alimentos indigestíveis pelo microbiota no cólon, podendo atingir o compartimento sanguíneo e o tecido adiposo, onde reduz os níveis de ácidos gordos no plasma através da inibição da lipólise e indução da lipogênese no tecido adiposo e a supressão da produção de ácidos gordos no fígado. Este é um mecanismo importante pelo qual os pré-antibióticos exercem os seus efeitos sobre doenças relacionadas com a obesidade. A redução dos ácidos gordos plasmáticos pode ser especialmente importante, uma vez que os seus teores elevados causam inflamação. Por outro lado, os ácidos gordos e os fatores que induzem resposta inflamatória causam resistência à insulina, de modo que os efeitos de redução do ácido propiónico podem levar a uma melhoria na sensibilidade à insulina. Estes efeitos benéficos são associados, geralmente, a uma redução do peso corporal. O ácido propiónico influencia, também, a produção de hormonas pelo tecido adiposo, como a indução da leptina, o que pode contribuir para a supressão da ingestão de alimentos, uma vez que a leptina é uma hormona que suprime a ingestão de alimentos através de receptores expressos no sistema nervoso central e neurónios vagais (Al-Lahham *et al.*, 2010; Björk *et al.*, 2016).

Outras importantes aplicações do ácido propiónico são a produção de plásticos e herbicidas, aromatizante na indústria de cosméticos, além das suas aplicações na indústria farmacêutica. Pode, também, ser usado na fabricação de diversos propionatos, que são utilizados em produtos farmacêuticos, plásticos, antifúngicos, entre outros (Ngome, 2013).

3.2.1. Produção do ácido propiónico por processos fermentativos

Atualmente, quase todo o ácido propiónico é produzido por síntese química baseada no petróleo, designada por rotas petroquímicas. No entanto, existe a preocupação com o esgotamento das reservas mundiais de matérias-primas fósseis maximizando o uso de matérias-primas renováveis, no sentido de alcançar sistemas de produção sustentáveis. Em virtude da crescente procura por produtos naturais orgânicos, da oscilação dos preços do petróleo e da necessidade de preservar o ambiente, a indústria tem explorado métodos alternativos como os processos fermentativos para a produção de ácido propiónico (Ngome, 2013; Boyaval, 1995).

As bactérias do género *Propionibacterium* (Figura 3.3) são capazes de produzir ácido propiónico em quantidades elevadas. São gram-positivas, imóveis, não formam esporos, anaeróbias ou anaeróbias facultativas, catalase-positivas e apresentam-se sob a forma de bastonetes curtos ou de cocos, de acordo com o meio em que se encontram. Apresentam um importante papel em vários processos industriais. São utilizadas há já algum tempo na produção de queijos tipo suíço e vitamina B12, sendo que também foram recentemente conhecidas pelas suas propriedades probióticas. São utilizadas como cultura e aditivos em alimentos para inibir o crescimento de fungos e em preparações farmacológicas (Wang e Yang, 2013; Castro *et al.*, 2014).



Figura 3.3 – Análise por microscopia electrónica de uma bactéria do género *Propionibacterium* (Adaptado de Rabah e Carmo, 2017).

O ácido propiónico pode ser produzido por bactérias propiónicas, as *Propionibacterium*, pela via dos ácidos dicarboxílicos, com ácido acético e succínico ou como subprodutos. Contudo, o baixo rendimento devido à inibição do ácido propiónico no crescimento celular e na síntese de ácido propiónico ainda constituem um problema para a produção deste composto por fermentação (Ngome, 2013). Segundo um estudo comparativo realizado por Himmi *et. al.*, utilizando glicerol ou glicose em condições anaeróbias e duas estirpes de propionibacterium, a *Propionibacterium acidipropionici* e a *Propionibacterium freudenreichii sp. shermanii*, uma maior produção de ácido propiónico era obtida quando as bactérias utilizavam o glicerol como fonte de carbono e energia. Em todos os casos, os produtos finais de fermentação eram os mesmos e consistiam em ácido propiónico como principal produto, ácido acético como principal subproduto e dois metabolitos menores, o n-propanol e o ácido succínico.

Como a maioria das fermentações de ácidos orgânicos, a fermentação com ácido propiónico é inibida pelo pH ácido. A tecnologia de fermentação convencional para a produção de propionato é, portanto, limitada pela baixa concentração de produtos obtidos e conseqüentemente um baixo rendimento do processo. Além disso, a fermentação é heterogénea, uma vez que o propionato é produzido juntamente com outros subprodutos, o que também torna a purificação do produto difícil e dispendiosa. Deste modo, a via de fermentação convencional para a produção de ácido propiónico é pouco viável quando comparada com a alternativa química (petroquímicas).

3.2.2. Toxicidade do ácido propiónico

Os testes toxicológicos dos aditivos obedecem a regras internacionais, porém são realizados em laboratórios utilizando animais, procurando sempre encontrar modelos o mais próximos possível à espécie humana. As doses diárias aceitáveis estabelecidas através dessas pesquisas, quando transformadas para o consumo humano, levam em conta tabelas previamente aceitas garantindo a segurança do consumidor. Contudo, dificilmente se consegue avaliar a interação entre o aditivo e outras substâncias ingeridas, sejam outros aditivos, substâncias presentes no ar ou mesmo medicamentos. Todos os aditivos são seguros desde que usados dentro dos limites especificados pela legislação e dentro das condições normais de uso e aplicação (Vasconcelos e Filho, 2010).

Estudos subcrônicos usando compostos relacionados com o propionato de cálcio e sódio apresentaram alguns efeitos adversos em animais, quando expostos a doses elevadas, levando a lesões no estômago, redução do consumo de alimentos e diminuição do crescimento. No entanto, num humano adulto, o propionato de sódio não apresentou efeitos adversos além de uma ligeira alcalinidade da urina. Além disso, é de ressaltar que o emprego de sais de sódio como conservantes eleva o consumo diário desse mineral, o que pode ser prejudicial à saúde humana pela correlação do sódio com a hipertensão arterial. Já o propionato de cálcio pode não causar toxicidade grave, no entanto há relatos de efeitos a longo prazo sobre a saúde (Phechkrajang, 2016; Honorato *et al.*, 2013).

Num estudo de alimentação crônica usando ácido propiónico, em ratos, o consumo de doses elevadas provoca hiperatividade, irritabilidade, danos hepáticos, hiperplasia, úlceras e outros danos no estômago (Al-Daihan e Bhat, 2015). No cérebro, o ácido propiónico, pode atravessar as membranas celulares e acumular-se dentro das células, induzindo uma acidificação intracelular que pode alterar as liberações de neurotransmissores e, finalmente, a comunicação e o comportamento neuronal, que se assemelham a alguns aspectos do autismo. Recentemente, as anormalidades comportamentais, eletrofisiológicas, neuropatológicas e bioquímicas após a exposição à toxicidade do ácido propiónico foram registradas como fatores etiológicos do autismo (Al-Salem *et al.*, 2016). Dado que este ácido gordo de cadeia curta é usado como aditivo alimentar e é produzido por certas espécies bacterianas, conhecidas como *Propionibacterium*, este pode fornecer uma ligação entre a dieta, os metabolitos enterobacterianos e uma predisposição genética para a etiologia subsequente de características autistas, persistentes em crias de ratos expostos. Um crescente número de evidências mostra distúrbios imunológicos, stress oxidativo e fraca capacidade de desintoxicação, juntamente com a elevação dos marcadores proapoptóticos no sangue periférico de pacientes autistas quando expostos a dose elevadas de ácido propiónico (Al-Daihan e Bhat, 2015; El-Ansary *et al.*, 2017; Brito, 2011; Al-Salem *et al.*, 2016).

A acidemia propiônica é uma doença autossômica recessiva rara, mas severa causada por uma deficiência na enzima propionil-CoA carboxilase. Esta é uma enzima mitocondrial que catalisa a conversão de propionil-CoA em metilmalonil-CoA, após o catabolismo de valina, isoleucina, treonina, metionina, ácidos gordos de cadeia de carbono ímpar e colesterol. Uma deficiência na propionil-CoA leva à acumulação de metabolitos de propionil-CoA no sangue e na urina. As primeiras manifestações clínicas são representadas por sinais não específicos de acidemia orgânica, sendo os sintomas vômitos, convulsões, deficiência intelectual, imunossupressão, predisposição para infecções e septicemia, seguidos de múltiplos danos nos órgãos, tais como atraso no desenvolvimento, cardiomiopatia, falta de proliferação, insuficiência hepática e renal (Al-Lahham *et al.*, 2010; Bernheim *et al.*, 2017).

Por outro lado, um estudo realizado por Türkoglu em células de *Allium cepa* demonstra que os sais de ácido propiónico (propionato de cálcio, propionato de sódio e o propionato de potássio) usados comumente na indústria alimentar apresentam efeitos cromotóxicos claros, uma vez que podem causar inibição da síntese de DNA devido à redução da atividade mitótica evitando, deste modo, que a célula entre em mitose, induzindo uma ampla gama de anormalidades mitóticas nas raízes de *A. cepa*. A utilização destes aditivos causaram pontes de anafase, micronúcleos, células binucleadas e viscosidade, o que significa que estes propionatos são clastogênicos, isto é, induzem quebras cromossômicas que levam ao retardamento cromossômico.

Contudo, o ácido propiónico é um componente normal do metabolismo humano e é utilizado pela maioria dos órgãos e tecidos. É consumido regularmente em produtos lácteos e em produtos de padaria e pastelaria sem consequências, uma vez que as doses utilizadas deste composto são baixas, sendo os riscos da exposição ao ácido propiónico muito baixos (US EPA, 1991).

Nos mamíferos, o ácido propiónico é metabolizado de modo similar a outros ácidos gordos, não tendo sido demonstrado que causa efeito tóxico nos níveis encontrados em alimentos (Fennema, 2010).

3.2.3. Legislação

A segurança na utilização de determinado aditivo está relacionada não só com a quantidade que é permitida naquele produto especificamente, mas também na sua quantidade total ingerida na dieta. Isto é importante para determinar condições de uso de aditivos as quais devem assegurar que a Ingestão Diária Recomendada (IDA) do aditivo não seja frequentemente excedida, mesmo por eventuais consumidores daquele produto em grandes quantidades. Assim, os aditivos são seguros desde que sejam utilizados dentro dos limites

especificados pela legislação e dentro das condições normais de uso e aplicação (Vasconcelos e Filho 2010; EFSA, 2011).

As recomendações a respeito da utilização de aditivos são feitas pelo Codex Alimentarius, que contém um comité de especialistas de vários países ligados à OMS, o qual discute e avalia a partir de observações, estudos e pesquisas as possibilidades de uso dessas substâncias nos alimentos (Vasconcelos e Filho, 2010). De acordo com o Codex Alimentarius, o nível máximo de uso de um aditivo corresponde à concentração mais alta desse aditivo, determinado como funcionalmente eficaz num alimento. Geralmente é expresso em mg de aditivo/kg de alimento. O nível máximo de uso, normalmente, não corresponderá ao nível de uso ideal recomendado. Sob as boas práticas de fabrico (BPF), o nível de uso ideal recomendado será diferente para cada aplicação de um aditivo e depende do efeito técnico pretendido e do alimento específico em que o aditivo será usado, tendo em consideração o tipo de matéria-prima, o processamento do alimento, o armazenamento, transporte e consumidores (EFSA, 2011).

Segundo o Codex Alimentarius, os limites para o uso de ácido propiónico e os seus sais de cálcio, sódio e potássio são BPF, ou seja, *quantum satis* – quantidade suficiente – para obter o efeito desejado, sempre que o aditivo não afetar a genuinidade do alimento. Contudo, isto não significa que pode ser usado em todos os alimentos.

Os aditivos utilizados segundo as Boas Práticas de Fabrico são aqueles onde a quantidade do aditivo adicionado ao alimento deve ser limitada ao nível mais baixo possível necessário para atingir o efeito desejado (Vasconcelos e Filho, 2010).

Por outro lado, a União Europeia com o objetivo de controlar a exposição da sua população ao ácido propiónico e com o intuito de ajustar os diferentes limites legais estabelecidos pelos seus países membros, estabeleceu teores oficiais máximos deste conservante através do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 de 16 de Dezembro. Contudo, o Regulamento (UE) n.º 683/2016 da Comissão de 2 de Maio de 2016, veio alterar o anexo II do regulamento anteriormente descrito no que diz respeito à utilização de ácido propiónico e os seus sais em “tortilhas”. Relativamente ao ácido propiónico os limites legislados para os diferentes géneros alimentícios podem ser observados na Tabela 3.2.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

Tabela 3.2 - Teores máximos (mg/kg) de ácido propiónico - propionatos estabelecidos pela União Europeia para os diferentes produtos alimentares (Regulamento (CE) n.º 1333/2008).

| Produtos alimentares | Teores máximos (mg/kg) |
|---|-------------------------------|
| Queijos curados (unicamente à superfície) | <i>quantum satis</i> |
| Produtos à base de queijo (unicamente à superfície de produtos curados) | <i>quantum satis</i> |
| Unicamente padaria fina pré-embalada (incluindo produtos de pastelaria) com atividade da água superior a 0,65 ^{(1) (6)} | 2 000 |
| Unicamente pão pré-embalado em fatias e pão de centeio ^{(1) (6)} | 3 000 |
| Unicamente pão com valor energético reduzido; pão parcialmente cozido pré-embalado; pãezinhos, «tortilhas» e pão pita pré-embalados; pão para cachorros, boller e dansk flutes pré-embalados ^{(1) (6)} | 2 000 |
| Unicamente pão pré-embalado ^{(1) (6)} | 1 000 |

(1) Os aditivos podem ser usados estremes ou em combinação.

(6) O ácido propiónico e os seus sais podem estar presentes em determinados produtos fermentados como resultado dos processos de fermentação em condições de boas práticas de fabrico.

O cumprimento desta legislação leva a que seja necessário desenvolver métodos analíticos precisos e confiáveis para a quantificação de propionatos em alimentos de várias matrizes de modo a garantir a segurança alimentar e a saúde do consumidor (Faraji *et al.*, 2016).

4. Métodos de determinação do ácido propiónico

A segurança alimentar é um fator chave da boa saúde. Por vezes alguns conservantes excedem os limites de regulamentação previstos para os diversos géneros alimentícios onde são aplicados (Phechkrajang, 2016). A determinação destes compostos e dos seus sais faz-se através de métodos analíticos adequados à finalidade a que se destinam. Atendendo à composição complexa de certas matrizes alimentares, bem como a sua ampla gama de propriedades físicas e químicas, torna-se necessário o recurso a técnicas de deteção seletivas e sensíveis. Assim, de modo a escolher o método mais adequado para a matriz em estudo é necessário ter em consideração vários fatores como o equipamento disponível, o tipo de resultado pretendido, ou seja, qualitativo ou quantitativo, a validação das técnicas bem como a legislação (Moares e Duarte, 2011; Ibáñez, 2003).

O ácido propiónico e os seus sais não constituem risco para a saúde do consumidor quando ingeridos nas doses regulamentadas, tornando-se necessária a padronização de um método rápido e preciso para ser aplicado na rotina de um laboratório de análise de alimentos, como parte de um programa de apoio à segurança alimentar. Assim, a validação de métodos analíticos torna-se necessária e imprescindível para se obter resultados credíveis e confiáveis (Campos *et al.*, 1997; US EPA, 1991).

De modo a avaliar a segurança dos alimentos, têm sido relatados e usados vários métodos analíticos para determinação quantitativa do ácido propiónico, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), e o método colorimétrico (Moares e Duarte, 2011; Phechkrajang, 2016; Campos *et al.*, 1997).

Alguns métodos analíticos usados para analisar o ácido propiónico apresentam etapas em comum, como a amostragem, homogeneização, extração, separação e a deteção. A homogeneização de amostras sólidas pode ser feita através de um moinho, sendo que quanto menor o tamanho das partículas, mais homogeneizada estará a amostra. Na extração, assume-se que o ácido propiónico extraído vai estar igualmente distribuído na fase líquida e excluída da fase sólida, sendo que a validade desta hipótese vai-se refletir nas taxas de recuperação do método. A técnica de extração envolve a separação e consiste na recuperação da parte líquida a fim de se isolar o ácido propiónico do extrato (Campos *et al.*, 1997; Lisboa, 2014).

4.1. Métodos cromatográficos

A análise de ácido propiónico é normalmente realizada recorrendo à cromatografia gasosa e à cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, que é explicada no capítulo seguinte.

A cromatografia gasosa (GC) é uma das técnicas mais utilizadas em análises qualitativas e quantitativas. Permite o estudo de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis. As colunas mais usadas na atualidade são as colunas capilares, constituídas por um tubo de sílica fundida, sendo a parede interna revestida pela fase estacionária. Por outro lado, destacam-se para a determinação do ácido propiónico, neste tipo de cromatografia os detetores de ionização de chama (FID), podendo ainda ser hifenizada com outras técnicas tal como a espectrometria de massas (MS). Um dos detetores mais poderosos para a cromatografia gasosa é o espectrómetro de massa. Esta hifenização é conhecida como GC-MS e combina o poder de separação da cromatografia com a capacidade de identificação da espectrometria de massa (Moares e Duarte, 2011; Alves, 2014).

A grande vantagem da utilização do acoplamento da MS a um sistema cromatográfico reside na sua capacidade em responder a todos os compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis. Assim, o MS é utilizado, para além do FID, de modo a ser seletivo evitando que se confunda o ácido propiónico com outras substâncias, quando trabalhamos com matrizes complexas. Usando este método, consegue-se analisar quantidades de ácido propiónico da ordem dos ppm com uma boa linearidade, repetibilidade e bons limites de deteção e quantificação (Skoog e West, 1998; Ibáñez, 2003).

De modo a se assegurar a extração ideal, o pH da amostra deve ser ajustado para ser suficientemente ácido de modo a garantir que o ácido propiónico e os seus sais se encontram na forma molecular não ionizada (Moares e Duarte, 2011).

No capítulo 5 é descrito de forma mais pormenorizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), uma vez que se trata do método aplicado na presente dissertação.

4.2. Método colorimétrico

O método colorimétrico é uma abordagem semiquantitativa. Geralmente, a análise qualitativa estabelece a identidade química das espécies na amostra, enquanto a análise quantitativa determina as quantidades relativas dessas espécies em resultados numéricos. A análise semiquantitativa encontra-se entre o método qualitativo e o método quantitativo, permite detectar a presença de um analito, incluindo a quantidade aproximada, comparando-se com um padrão. Normalmente, o reagente usado para esta determinação é o sulfato de amónio

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

férrico que vai originar um complexo vermelho-castanho. É utilizado um controlo negativo e um positivo de modo a que se possa observar a presença, ou não, do analito (Phechkrajang, 2016).

5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

5.1. História

A cromatografia é um poderoso método de separação com aplicação em todos os ramos da ciência (Silva, 2012). Ganhou importância em 1906, através do botânico russo Mikhail Tswett, ao criar um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura envolvendo a distribuição diferencial destes num sistema heterogêneo bifásico, fase estacionária e fase móvel. O botânico conseguiu separar vários pigmentos de plantas, como clorofila e xantofila, em folhas verdes de plantas utilizando uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel, ocorrendo a separação dos componentes em faixas coloridas culminando, deste modo na escolha do nome do método – em grego *choma* significa cor e *graphein* que significa escrever- embora o método não dependa da cor. Apesar de terem sido desenvolvidos estudos semelhantes, Tswett foi o primeiro a compreender e interpretar este processo como é aceite atualmente, empregando o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se moviam dentro da coluna, sendo, por isso, considerado o pai da cromatografia (Silva, 2012 ; Nollet, 2000).

A técnica cromatográfica foi praticamente ignorada até ao ano de 1930, sendo redescoberta por Kuhn e Lederer que aperfeiçoaram a cromatografia em coluna. Depois de Tswett diversos cientistas contribuíram para o avanço quer teórico quer prático da cromatografia, levando ao aperfeiçoamento da técnica que, em conjunto com avanços tecnológicos foi levada a um alto grau de sofisticação que culminou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas. O grande impacto desses métodos na ciência é provado pelo Prémio Nobel de 1952 recebido por Martin e Synge pelas suas descobertas que lançaram bases fundamentais sobre a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (Kuhn, 2009).

Entre o ano de 1937 e 1972 foram atribuídos 12 prémios Nobel, provando que as técnicas cromatográficas desempenham um papel fulcral, sendo a técnica de separação mais importante do século XX (Silva, 2012).

No início do desenvolvimento da cromatografia líquida, os cientistas perceberam que a eficiência da coluna podia ser aumentada através da diminuição das partículas da fase estacionária. Somente a partir dos anos 70 foi possível um avanço considerável na cromatografia líquida moderna. O avanço foi gradual e atingiu o atual nível de sofisticação que o HPLC apresenta. Para tal avanço foram, então, desenvolvidas colunas cromatográficas com partículas menores, responsáveis por uma melhor eficiência e bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel e para tornar o tempo de análise mais curto (Peres, 2002 ; Meyer, 2004).

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica analítica de separação mais usada. As razões para a popularidade do método são a sua sensibilidade, a fácil adaptação para

determinações quantitativas, a sua adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, a sua ampla aplicabilidade a substâncias de elevado interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e até mesmo para o público (Silva, 2012).

5.2. Conceitos e parâmetros operatórios

Ao proceder a uma separação cromatográfica por cromatografia líquida, obtém-se um cromatograma, isto é, uma representação gráfica da separação referida por meio de picos correspondentes a cada componente da amostra. De modo a que se possa avaliar qualitativamente essa separação, é necessário definir termos como resolução, capacidade de retenção e seletividade, relativos à separação ou ao sistema cromatográfico (Chust, 1990). A Figura 5.1 tipifica um cromatograma no qual se identifica uma sucessão de picos correspondentes aos componentes separados, assim como algumas grandezas características de uma análise cromatográfica.

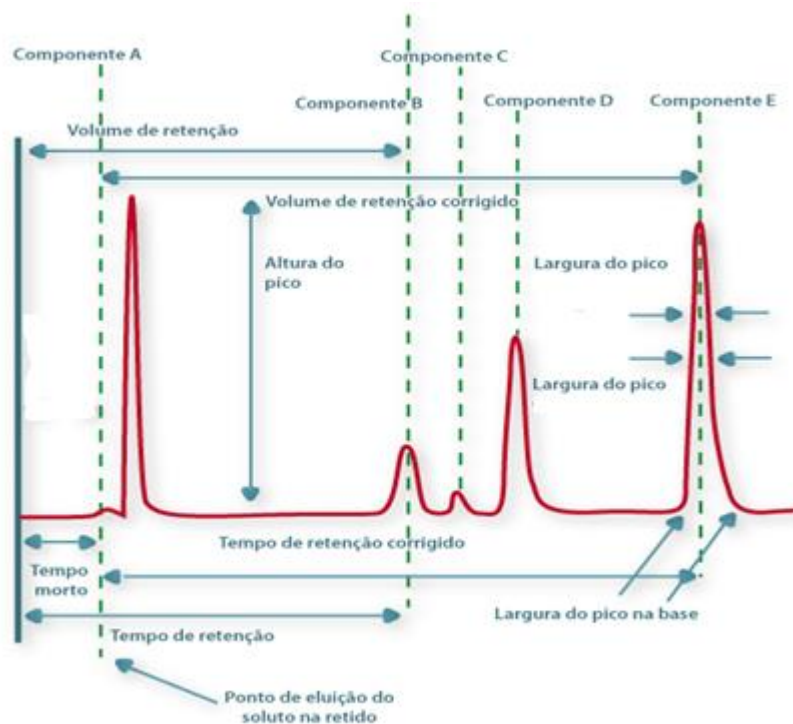


Figura 5.1 - Representação de um cromatograma (Adaptado de Scott, 2003).

Define-se resolução como o grau ou magnitude da separação, ou seja, é o grau segundo o qual um pico se distingue de outro num cromatograma. É expressa como a razão entre a distância de dois picos, no ponto máximo, pelo valor médio da largura de ambos os picos, na linha de base, sendo uma grandeza adimensional. A resolução dos picos cromatográficos depende de dois parâmetros operatórios, a seletividade e a eficiência da coluna, deste modo,

aumentando a seletividade da coluna, os picos afastam-se; aumentando a eficiência os picos mantêm a distância entre eles, mas tornam-se mais estreitos (Scott, 2003; Chust, 1990).

A capacidade de retenção é o termo utilizado para identificar ou localizar um pico, ou seja, mede a capacidade de um sistema cromatográfico para reter os componentes da amostra. Já a seletividade está relacionada com a química envolvida na separação. Este fator indica quando um pico eluí relativamente a outro, estando diretamente relacionado com a capacidade do sistema em promover a separação (Chust, 1990).

Ao longo do tempo foram surgindo outros fatores para avaliar a capacidade de separação de uma coluna, como o volume de retenção, o número de pratos teóricos e eficiência da coluna (Silva, 2012).

O número de pratos teóricos descreve a dispersão do pico cromatográfico em relação ao seu centro, constituindo ao mesmo tempo um método fácil para o controle diário da eficiência do sistema. Se os picos não forem simétricos e apenas se aproximarem da forma gaussiana o número de pratos teóricos será baixo. A eficiência de uma coluna é frequentemente expressa como a altura equivalente a um prato teórico, ou seja, é a relação entre o tempo de permanência do analito na coluna e o alargamento de bandas (Scott, 2003; Chust, 1990).

O tempo de retenção corresponde à medida em função do tempo, entre o ponto de injeção da amostra e o pico de um componente que emerge da coluna e pode variar com o fluxo, o comprimento e o diâmetro da coluna. Já o tempo morto corresponde ao tempo em que o componente que não interage com a fase estacionária é eluído. O volume de retenção corresponde ao volume da fase móvel que é necessário para eluir uma substância de um determinado sistema cromatográfico (Porto, 2014).

Outro conceito usado em cromatografia é o processo de eluição, este indica a passagem do eluente pela coluna. A eluição pode ser isocrática, ou seja, a composição da fase móvel é mantida constante durante toda a análise cromatográfica e, nesse caso utiliza-se apenas uma bomba; ou por gradiente, quando há alteração da composição da fase móvel, aqui, o bombeamento pode ser feito a baixa pressão, utilizando apenas uma bomba, ou a alta pressão, onde cada solvente tem uma bomba específica (Peres, 2002).

Em HPLC, a temperatura também pode influenciar o processo de separação uma vez que com o aumento da temperatura o desempenho da coluna cromatográfica pode aumentar devido à diminuição da viscosidade da fase móvel. A temperatura deve ser controlada de modo a uma boa otimização de uma separação, pois, a falta de controlo pode resultar numa baixa reprodutibilidade e/ou em picos de baixa resolução (Meyer, 2004).

5.3. Aplicação

O HPLC é usado em análises de compostos não voláteis ou em compostos termicamente instáveis onde outro tipo de cromatografia, nomeadamente a gasosa, não pode ser utilizada. Uma vez que cerca de 80% dos compostos apresentam essas características, o campo de aplicação do HPLC é extremamente vasto, podendo ser aplicado na indústria como em Universidades e Departamentos Governamentais (Chust, 1990).

É aplicado quer seja para análises de controlo de qualidade de rotina, sendo também usado como ferramenta na área de investigação. O único requisito do método é que a amostra seja solúvel na fase móvel (Silva, 2012).

5.4. O sistema de HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica com a capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos que estão presentes numa mistura. A separação processa-se por meio de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto (amostra) e duas fases, a fase móvel e a fase estacionária (Porto, 2014; Chust, 1990). A fase móvel flui continuamente através do sistema, arrastando a amostra injetada pela coluna e pelo detetor e deve respeitar algumas características impostas pelo método. A principal característica é que a fase móvel dissolva a amostra sem qualquer interação química entre ambas de modo a não decompor os seus componentes para que estes sejam transportados pela coluna sem que haja modificação, devendo, esta fase apresentar um elevado grau de pureza ou ser de fácil purificação levando à realização de análises de alta sensibilidade, uma vez que as impurezas podem interferir na deteção do analito por UV e noutros detetores. A fase móvel deve, também, ser compatível com o detetor empregado e possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica, ou seja, um cilindro rígido, normalmente de aço ou vidro, no interior do qual se encontra um material de enchimento formado por pequenas partículas classificadas quanto ao seu tamanho em macropartícula, intermédias ou micropartículas. Quanto menor for a partícula, maior será a eficiência da separação, pois, partículas menores reduzem a distância de contacto do soluto com as fases estacionária e móvel, facilitando o equilíbrio e, conseqüentemente, melhorando a eficiência da coluna (Chust, 1990; Peres, 2002; Silva, 2012).

Na cromatografia líquida clássica, os componentes da amostra são arrastados pela fase móvel através da coluna apenas pela força da gravidade, em HPLC por serem utilizadas partículas menores no enchimento da coluna é necessário o uso de uma bomba de alta pressão para que a separação decorra num espaço de tempo mais curto. Os componentes básicos de um equipamento de HPLC são uma bomba de alta pressão, um injetor, uma coluna

cromatográfica, um detetor e um computador (processador de dados) (Kuhn, 2009 ; Meyer, 2004). Na Figura 5.2 estão representados os componentes essenciais para o funcionamento do HPLC.

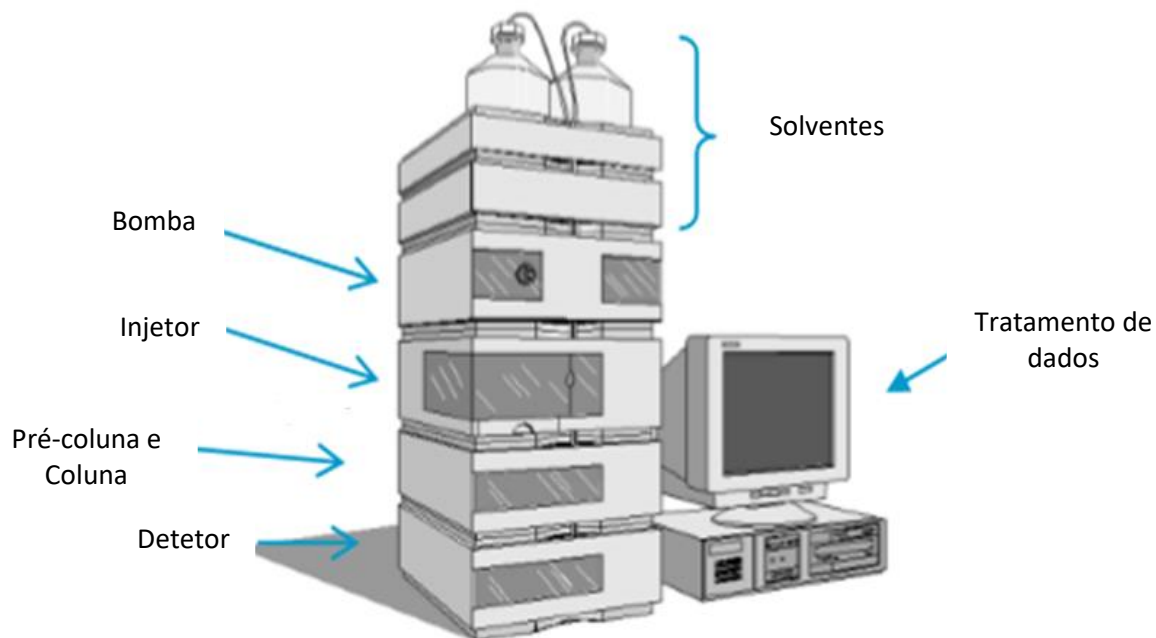


Figura 5.2 - Principais componentes do HPLC (Adaptado de Gratzfeld-Hüsgen 2001).

5.4.1. Bomba

No HPLC as bombas utilizadas são de alta pressão, devendo ser possível controlar a sua pressão máxima. Uma bomba de HPLC moderna deve ter um fluxo contínuo, uma taxa de fluxo com alta precisão e um baixo volume morto, além disso, deve ser possível o controlo da pressão máxima e pelo menos duas frentes de solvente para gradientes de fase móvel, bem como a precisão e exatidão na composição de mistura dos gradientes (Gratzfeld-Hüsgen, 2001).

A utilização de alta pressão é necessária, pois as partículas exercem uma alta resistência ao fluxo da fase móvel e, caso não fosse utilizada a análise tornava-se muito lenta. A variação do fluxo resulta na alteração dos tempos de retenção e das áreas dos picos, daí a necessidade de o fluxo ser constante e ter a possibilidade de ser ajustado consoante o procedimento utilizado para a determinação de analitos, devendo utilizar-se baixos fluxos de modo a permitir uma boa reprodutibilidade e precisão. A gama de fluxo pode variar de 0,1 mL/min a 10,0 mL/min. O sistema de bombeamento, também é usado para a realização de gradientes de eluição quando os compostos apresentam fator de separação muito próximo (Silva, 2012; Chust, 1990).

Na cromatografia líquida de alta eficiência a elevada pressão por si só não é o que se pretende, pois esta provem do fato da fase móvel ser um líquido com uma viscosidade relativamente elevada, que necessita de ser pressionada através de um leito de partículas densas muito finas. As pequenas partículas têm caminhos de difusão curtos e, portanto, produzem um elevado número de pratos teóricos por unidade de comprimentos (Meyer, 2004).

Atualmente, as bombas são compostas por êmbolos com válvulas que regulam o fluxo com uma maior precisão. Existem dois tipos com estas características: as pneumáticas e as mecânicas, capazes de controlar a pressão e manter o fluxo constante, respetivamente (Meyer, 2004).

As bombas pneumáticas utilizam-se quando são aplicadas pressões acima dos 500 bar. Neste tipo de bomba, um gás exerce uma pressão, ativando a maior área de secção transversal do pistão e a outra extremidade encontra-se em contacto com o eluente sobre uma área muito menor. A força é a mesma nos dois lados do pistão, mas a pressão é mais elevada na área menor de acordo com a proporção das duas áreas (Silva, 2012; Meyer, 2004).

As bombas mecânicas podem ser divididas em bombas de pistão recíprocas e bombas tipo seringa. As bombas de pistão recíprocas são o tipo de bombas mais comuns em HPLC. A fase móvel é bombeada pelo deslocamento de um pistão controlado por um motor, enquanto as válvulas abrem e fecham o líquido segue na direção apropriada. Com cada movimento, o êmbolo transmite uma pequena quantidade de líquido. As bombas do tipo seringa são formadas por um pistão que se move por ação de um mecanismo de rosca, sustentado por um motor, o fluxo é contínuo, contudo têm capacidade total limitada, sendo necessário parar o enchimento após o fornecimento de uma quantidade relativamente baixa de solvente (Meyer, 2004; Gratzfeld-Hüsgen, 2001).

5.4.2. Injetor

O processo de separação cromatográfica começa quando a amostra, juntamente com a fase móvel é injetada logo no início da coluna. A amostra é bombeada e percorre a coluna, onde vai ocorrer a separação dos analitos (Porto, 2014). Para se obter uma boa eficiência em análises cromatográficas, um fator muito importante a ter em conta é a maneira como se introduz a amostra na coluna, uma vez que a amostra deve ser reprodutível e ter grandes variedades de volumes, assim como não deve introduzir bolhas e devem resistir a altas pressões (Silva, 2012).

Duas são as formas de injeção da amostra, sendo elas a injeção com microseringas e a injeção com válvula rotatória (injeção automática). O injetor de seringa apresenta uma baixa reprodutibilidade e necessita de um septo para evitar o retorno da amostra e do êmbolo para fora do injetor, já o sistema de injeção de válvula rotatória é o mais utilizado, pois apresenta

uma boa reprodutibilidade e elimina o problema de retorno da amostra. Neste sistema o volume injetado não necessita de ser exato, uma vez que a válvula rotatória possui uma alça capilar amostradora (loop) capaz de selecionar volumes de 1 a 100 μL de amostra, sendo o excesso levado para fora do equipamento (Silva, 2012; Meyer, 2004).

Uma válvula de injeção típica é uma válvula de seis portas (Figura 5.3), que possui duas posições: a posição de carga e a posição de injeção. Para introduzir a amostra, a válvula é colocada na posição de carga, onde a fase móvel ultrapassa o loop de amostra e flui diretamente a partir da bomba através da válvula para a coluna. Para introduzir a amostra no cromatógrafo, a válvula passa para a posição de injeção e a fase móvel é utilizada para impulsionar a amostra para a coluna (Nollet, 2000).

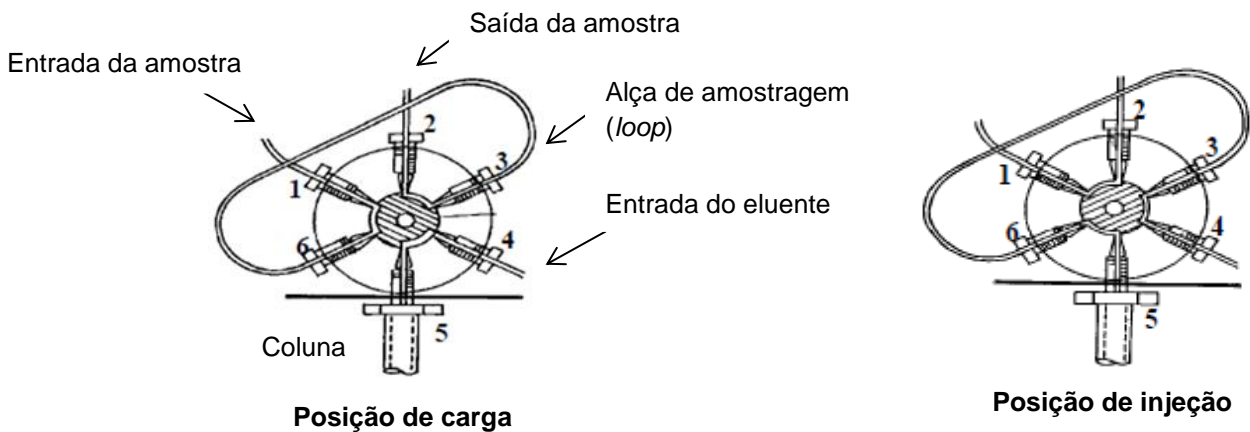


Figura 5.3 - Representação de injetor de 6 válvulas (Adaptado de Nollet, 2000).

Uma das evoluções do método de HPLC são os injetores automáticos que permitem uma elevada reprodutibilidade e que resistem a altas pressões conseguindo-se, deste modo melhores resultados na análise quantitativa (Chust, 1990). Os injetores automáticos contêm uma versão acionada mecanicamente da válvula de seis portas, o funcionamento é semelhante ao das válvulas manuais, mas a amostra é introduzida automaticamente a partir dos vials que se encontram num carrossel. O formato de carrossel é um meio confiável e rápido de transporte de amostras para posterior injeção (Gratzfeld-Hüsgen, 2001).

5.4.3. Pré-coluna

A pré-coluna encontra-se, tal como o nome indica, antes da coluna e serve de proteção entre o injetor e a coluna. Contém o mesmo enchimento da coluna analítica impedindo a contaminação por impurezas, evitando alterações no desempenho da coluna e aumentando o seu tempo de vida. Funciona, também, como saturador da fase móvel impedindo assim o seu arrastamento na coluna (Meyer, 2004).

5.4.4. Coluna cromatográfica

A coluna cromatográfica é onde se dá o processo de separação das substâncias que compõem a amostra, tornando-a o constituinte mais importante e mais crítico de um sistema cromatográfico. A maioria das colunas de HPLC é feita de aço inoxidável, inertes à corrosão química, resistentes à pressão e reaproveitáveis, não sendo necessária a sua regeneração após cada separação. De acordo com as características da amostra em estudo poder-se-à escolher a coluna que melhor se adapta, conforme essas características da amostra pode ser definida de várias formas como está representado na Figura 5.4. Além disso, numa coluna cromatográfica há a considerar dois fatores que a caracterizam, são eles os fatores químicos que dizem respeito ao enchimento (propriedades químicas, área superficial, entre outros) e fatores mecânicos que dizem respeito ao invólucro (como o comprimento, diâmetro interno, material, entre outros) (Silva, 2012; Chust, 1990; Meyer, 2004).

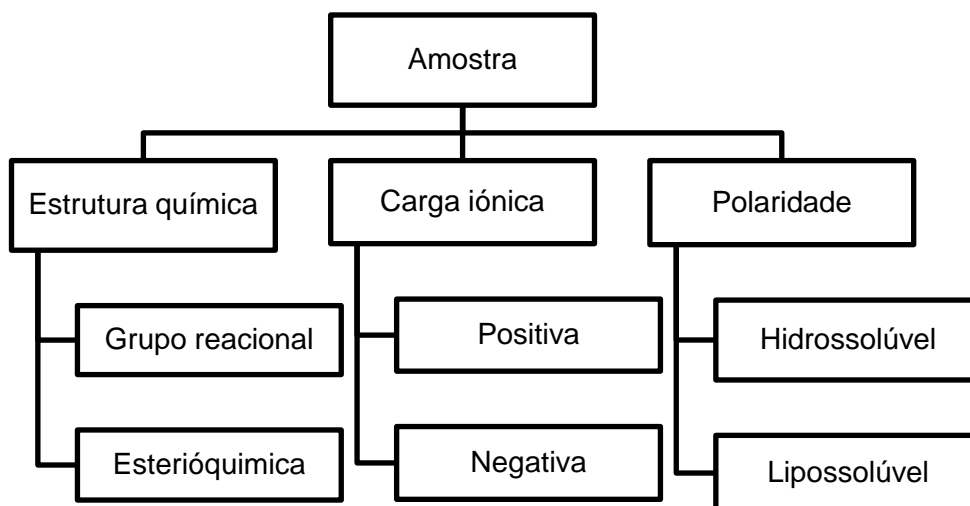


Figura 5.4 - Propriedades físico-químicas da amostra (Adaptado de Chust, 1990).

O comprimento da coluna afeta tanto a eficiência como a velocidade da separação. A utilização de colunas mais longas resulta em tempos de análise mais longos, contudo, a eficiência da coluna tende a aumentar com o tempo de análise. No geral, são utilizadas colunas curtas para separações simples, sendo que as colunas analíticas podem variar entre 30 a 300 mm de comprimento. Os enchimentos mais comuns em HPLC são micropartículas de vários tamanhos, formas e porosidades. O tamanho dos poros diz-nos a superfície com a qual a amostra interage. Assim, para um bom funcionamento das colunas, as suas partículas devem ser pequenas e esféricas, o que vai levar a um aumento da sua eficiência, uma elevada área superficial e a uma maior retenção, devendo ser resistentes às altas pressões utilizadas em

HPLC e quimicamente inertes em todos as condições de pH e natureza do eluente (Peres, 2002; Chust, 1990; Meyer, 2004).

Quando a fase estacionária é mais polar, que a fase móvel, diz-se que a cromatografia é de fase normal. Desta forma, numa solução que contenha compostos mais polares que outros, esses compostos mais polares vão ter uma maior afinidade com a fase estacionária, saindo da coluna de separação mais tarde do que os compostos menos polares. Neste tipo de cromatografia, os adsorventes da fase estacionária mais usados são normalmente a sílica e a alumina. Por outro lado, quando a fase estacionária é menos polar que a fase móvel, diz-se que a cromatografia é de fase reversa. Neste tipo de cromatografia, os compostos apolares ou fracamente polares, são mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel. A retenção na fase estacionária é tanto maior quanto menor for a sua solubilidade na fase móvel. Neste tipo de cromatografia, utilizam-se como adsorventes da fase estacionária substâncias quimicamente modificadas com ligações de grupos funcionais. Contudo a cromatografia de fase reversa é a mais utilizada em HPLC, uma vez que os compostos analisados são, na sua maioria, polares e a adsorção é mais homogénea (Porto, 2014).

O tipo de colunas conhecidas como C8 e C18 (sílica octadecil), normalmente as mais usadas, são responsáveis pela maioria das separações na cromatografia de fase reversa. O tempo de retenção aumenta à medida que o número de átomos de carbono aumenta, pois, aumenta a área de contacto entre a molécula da amostra e a fase estacionária. Os eluentes mais usados são o metanol, o acetonitrilo e a água (Meyer, 2004; Chust, 1990; Peres, 2002).

5.4.5. Detetores

Tendo como função monitorizar o fluxo da fase móvel na saída da coluna, o detetor mede de forma contínua propriedades físicas ou físico-químicas da amostra, ou da solução que a contém enviando um sinal, que é registado num processador de dados na forma de picos cromatográficos e cuja área, é, geralmente, proporcional à concentração do componente na amostra. A interpretação desse registo produz dados qualitativos e quantitativos sobre a amostra e os seus constituinte. Assim, a sensibilidade de um detetor é determinada a partir da relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera o sinal. Por outro lado, a linearidade é a faixa linear do sistema, onde o sinal do detetor é diretamente proporcional à concentração do soluto (Silva, 2012; Peres, 2002).

Atualmente existe uma vasta gama de detetores para HPLC, sendo que a escolha de qualquer um deles dependerá essencialmente das características químicas ou estruturais dos analitos a detetar e da forma como estas interagem com o eluente (Chust, 1990).

As características desejáveis para um detetor de HPLC são: ter alta sensibilidade, baixo limite de detecção, uma ampla faixa de linearidade, ser confiável e reprodutível, dar informação quantitativa e qualitativa, não destruição do soluto, ter insensibilidade a mudanças de temperatura, dar uma resposta rápida e linear a alterações das concentrações dos solutos e ter um baixo nível de ruído (Peres, 2002).

Os detetores mais utilizados em HPLC são:

- Ultravioleta – Visível (UV-Vis) e de díodos: São chamados de detetores fotométricos uma vez que se baseiam na absorvência da luz pelo analito ao passar pelo detetor. São os detetores mais utilizados em HPLC, pois, apresentam um baixo custo, são praticamente insensíveis a pequenas variações de fluxo e temperatura e totalmente compatíveis para gradientes de solventes. É um detetor seletivo detetando apenas os compostos que absorvem no comprimento de onda em que o detetor for ajustado. A única desvantagem é a sua seletividade, não podendo ser utilizado na detecção de lípidos, hidrocarbonetos lineares, hidratos de carbono, ácidos gordos e a maioria dos polímeros. O de díodos permite que a absorvência de uma amostra em todos os comprimentos de onda seja determinada de modo simultâneo. O seu princípio é baseado na absorção de luz ultravioleta, por parte da amostra. Outro fator importante é que estes detetores apresentam diferentes sensibilidades para diferentes comprimentos de onda, tornando-se necessário especificar-se em que região do espectro se vai trabalhar, mas a resolução espectral depende do tipo e do número de díodos que compõe o arranjo (Silva, 2012; Chust, 1990).

- Fluorescência (FLD): São os detetores de maior sensibilidade, utilizados como método de detecção específica, pois são sensíveis para substâncias que têm fluorescência. Possuem todas as vantagens dos detetores UV- Vis e ainda a especificidade de permitir discriminar os constituintes de interesse numa matriz complexa de substâncias não fluorescentes. São constituídos por uma lâmpada de excitação seguida de um filtro de excitação ou uma rede de difração, incidindo o feixe luminoso sobre a célula de amostra e excitando-a, originando a emissão de um feixe de luz ao regressar ao estado fundamental. Este feixe de luz é seguidamente dirigido a um segundo filtro ou monocromador que vai seleccionar o comprimento de onda emitido, fazendo-o incidir no fotodetector. A principal desvantagem de um detetor FLD é o seu custo, superior ao de um detetor UV- Vis (Meyer, 2004; Chust, 1990; Peres, 2002).

- Índice de refração: São detetores que apresentam resposta para qualquer tipo de amostra. Acompanham continuamente a diferença do índice de refração entre a fase móvel e o eluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra (Peres, 2002). São constituídas por uma lâmpada de emissão que incide o seu feixe luminoso sobre uma célula dupla (amostra/referência), um espelho e um fotodetector. Quando ambas as células estão equilibradas (cheias com fase móvel), a luz que as atravessa não sofre qualquer tipo de desvio (deflexão), incidindo na sua totalidade sobre o espelho e refletindo no fotodetector. Contudo, quando na célula da amostra passa uma substância, a luz sofre um desvio, incidindo em menor

intensidade no espelho e conseqüentemente no fotodetector. A deflexão/refração é tanto maior quanto maior for a diferença de composição entre ambas as células, isto é, quanto maior for a concentração da substância a quantificar. A principal desvantagem deste tipo de detetor é a sua alta sensibilidade a variações de fluxo e temperatura, sendo também incompatível com gradientes de solventes (Chust, 1990; Meyer, 2004).

- Eletroquímico: Apresenta uma elevada sensibilidade na detecção de amins biogénicas. Baseia-se na possibilidade de muitos compostos serem oxidados ou reduzidos quando se aplica um potencial elétrico. Os detetores eletroquímicos possuem uma grande sensibilidade de detecção e permitem uma grande especificidade na identificação dos analítos, obtida através da possibilidade de seleção do potencial redox da reação (Argenton, 2010).

- Espectrometria de massa (MS): São detetores muito sensíveis e seletivos que convertem as moléculas do analíto num estado ionizado, seguido da fragmentação e detecção desses iões com base na sua relação de massa/carga. Estes detetores permitem uma identificação, quantificação e uma caracterização molecular e estrutural de amostras com base na sua composição elementar (Meyer, 2004; Nollet, 2000).

5.4.6. Processador de dados

Para armazenar e analisar os dados cromatográficos utiliza-se um computador. Não só controla todos os elementos do HPLC, como também converte o sinal do detetor em cromatograma e usa-o para determinar o tempo de eluição (tempo de retenção) dos componentes da amostra (análise qualitativa) e a quantidade de amostra (análise quantitativa) através das áreas dos picos para posteriormente, através de cálculos, se obter a concentração da amostra analisada (Gratzfeld-Hüsgen, 2001).

5.5. Possíveis problemas e limitações

Apesar do HPLC ser um excelente equipamento para a separação dos analítos em estudo de uma determinada amostra, o operador pode-se deparar com certas dificuldades, tais como, uma má resolução dos picos, picos distorcidos, entre outros, sendo que estes problemas podem ser resolvidos através do controlo de certos fatores e com um operador experiente. Para além destas dificuldades, o equipamento apresenta um alto custo, tanto na sua aquisição como na sua manutenção. O detetor constitui também um dos problemas do HPLC, pois, uma vez que não existe um ideal há a necessidade de variar de detetor dependendo do tipo de composto que se pretende analisar. Contudo, as principais vantagens deste equipamento centram-se no fato de ser bom para uma análise quantitativa, ser versátil e autónomo (Nollet, 2000).

6. Validação de métodos analíticos

Cada vez mais se caminha em busca da qualidade, tornando-se indispensável conhecer cada fase de um processo produtivo. Como tal, a validação de métodos analíticos é uma etapa fundamental uma vez que se trata de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, sendo um aspeto vital da garantia da qualidade analítica de modo a que se produzam resultados credíveis. Através deste processo pode-se demonstrar que o método analítico em causa é adequado para a análise de um determinado analito numa certa matriz a um determinado nível de concentração, conduzindo a resultados fiáveis com boa exatidão e precisão, uma vez que o objetivo da validação é demonstrar que o método é credível e adequado para o fim pretendido (Ferreira, 2010; Silva, 2010).

A validação de um método é um processo contínuo, começando no planeamento de uma estratégia analítica e continua durante todo o seu desenvolvimento. Deve ser iniciada após o conhecimento do método a validar, no qual os analistas adquirem conhecimentos sobre as condições de armazenamento e manuseamento das amostras, armazenamento e preparações de reagentes, realização dos ensaios, procedimentos de controlo da qualidade e interpretação de resultados (Silva, 2010).

Em Portugal, os processos de validação implementados por Laboratórios químicos devem ter em consideração as condições indicadas no Guia RELACRE 13, sendo que a Norma NP EN ISO/IEC 17025, também, contem um item referente à validação de métodos analíticos.

Os métodos de ensaio podem ser métodos normalizados, método que segue o que se encontra indicado numa norma e são geralmente validados através de ensaios interlaboratoriais e posteriormente transcritos para uma norma, ou métodos internos, estes não seguem nenhuma norma e são geralmente validados internamente por um laboratório (Martins, 2016).

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações passíveis de acumularem erros, sistemáticos e/ou aleatórios, podendo em alguns casos alterar de forma significativa o valor do resultado final. Os erros associados às medições analíticas podem ter diferentes origens, como: erros aleatórios de medição (afetam a repetibilidade), efeito de matriz, efeito de corrida e efeito do laboratório (Silva, 2010; RELACRE, 2000).

Quando se pretende validar um método interno, é necessária a descrição e caracterização detalhada de todos os passos do estudo experimental de modo a que qualquer pessoa com a devida preparação possa executar a análise. Além disso, nos documentos que permanecerão no laboratório também é necessário colocar o título do método, o código de identificação, a sua revisão, a data de entrada em vigor da análise, os responsáveis pela elaboração e aprovação do ensaio e o número de cada página (RELACRE, 2000).

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos parâmetros seguintes:

- Gama de trabalho/ Linearidade;
- Limiares analíticos;
- Sensibilidade;
- Precisão;
- Exatidão.

Estes parâmetros podem variar dependendo do tipo de método, isto é, para uma análise qualitativa não há necessidade de testar e validar a linearidade do método, o limite de quantificação, a precisão e a exatidão, sendo os limites de deteção, a seletividade/especificidade e a robustez os pontos mais importantes na validação. Por outro lado, em análises quantitativas, caso aplicado em gamas vestigiais, todos os requisitos acima citados são importantes (RELACRE, 2000).

6.1. Curva de calibração

A curva de calibração é um parâmetro muito importante no que toca à validação de métodos quantitativos uma vez que indica a relação entre o sinal medido pelo equipamento (área ou altura pico) e a concentração conhecida do analíto. Para a realização de uma calibração analítica do equipamento, procede-se à preparação de soluções padrão cuja concentração é conhecida. Estas soluções padrão são medidas no equipamento nas mesmas condições das amostras a analisar. Os padrões devem distribuir-se igualmente pela gama de trabalho, tendo em conta que o branco de calibração por vezes é diferente de zero e deve integrar a curva (RELACRE, 2000).

Utilizando o método dos mínimos quadrados, a variável independente (x) representa sempre as concentrações dos padrões e a variável dependente (y) representa sempre a resposta cromatográfica. Assim, quando a curva de calibração representa uma função polinomial de primeiro grau, isto é, uma reta, pressupõe-se que os erros têm uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias ao longo da reta (RELACRE, 2000; Francisco, 2008).

A equação da reta da curva de calibração é dada por $y = a + bx$, sendo que (a) é a ordenada na origem e (b) o declive da reta. Por outro lado, um dos parâmetros de avaliação da calibração analítica é o coeficiente de correlação, que abrange uma gama de valores entre -1 e 1, sendo que -1 corresponde a uma correlação negativa (declive negativo) e 1 corresponde a uma correlação positiva (declive positivo). Contudo, em análise química, as curvas de calibração, no geral, devem apresentar valores de coeficiente de correlação superiores a 0,995 (RELACRE, 2000).

6.1.1 Gama de trabalho

A gama de trabalho de um método analítico corresponde ao intervalo de concentrações utilizadas, concentração mais baixa e concentração mais elevada, determinadas experimentalmente com precisão, exatidão e linearidade. Os primeiros valores da curva podem ser os valores dos limites de detecção, para o extremo inferior, e os limites de quantificação, para o extremo superior da curva (Ferreira, 2010; RELACRE, 2000).

Para escolher a gama de trabalho, quando se tem uma amostra específica, a concentração da amostra deve situar-se a meio da curva, já quando a concentração do analito é desconhecida, utiliza-se a curva estudada e os valores têm de se encontrar dentro da curva (Ribani et al., 2004).

De acordo com o Guia RELACRE 13, quando se utiliza uma metodologia que envolve a realização de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade de variâncias, analisando-se 10 vezes o primeiro (S^2_1) e o último padrão (S^2_{10}), de maneira a calcular as variâncias associadas aos mesmos, usando a equação:

$$S^2_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} (Y_{i,j} - \bar{y}_i)}{n_i - 1} \quad (6.1)$$

Sendo:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} Y_{i,j}}{n_i} \quad (6.2)$$

Onde i corresponde ao número do padrão, j o número de repetições feitas para cada padrão y_i corresponde aos valores do sinal do equipamento e \bar{y} corresponde à média aritmética dos valores do sinal do equipamento.

As variâncias são avaliadas de modo a se verificar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho. Deste modo é calculado o valor teste PG através das seguintes equações. De seguida, compara-se o valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher para n-1 graus de liberdade.

$$PG = \frac{S^2_{10}}{S^2_1} \quad (6.3)$$

$$PG = \frac{S^2_1}{S^2_{10}} \quad (6.4)$$

(6.3) Quando $S^2_{10} > S^2_1$

(6.4) Quando $S^2_1 > S^2_{10}$

Se o valor de $PG \leq$ ao valor de F , concluí-se que as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho encontra-se bem ajustada, por outro lado, se o valor de $PG >$ que o valor de F concluí-se que as diferenças de variância são significativas e, conseqüentemente, a gama de trabalho deverá ser ajustada até as variâncias do primeiro e último padrão não sejam estatisticamente diferentes, isto é, $PG \leq F$.

6.1.2. Linearidade

A linearidade caracteriza-se pela capacidade de obter resultados linearmente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo determinado, ou seja, verificar se existe uma relação linear entre os valores medidos e as concentrações dos padrões de calibração (Francisco, 2008).

A linearidade do método pode ser demonstrada de uma forma simplificada através do estudo dos parâmetros da reta ($y = a + bx$): declive (a), ordenada na origem (b) e o coeficiente de correlação (r^2). Uma vez que este último parâmetro é um bom indicador de correlação e não de linearidade torna-se necessária a realização de outros testes complementares ao coeficiente de correlação de modo a garantir uma avaliação fiável da linearidade (Francisco, 2008; Ribani et al., 2004).

No caso deste trabalho, o teste complementar realizado foi o teste de RIKILT. Este permite analisar a linearidade em cada ponto da reta. Assim, determina-se a razão entre o sinal instrumental (y_i) e a concentração do padrão (x_i) para cada ponto da reta e a média das razões obtidas $(y_i/x_i)_m$, e é calculada a percentagem de linearidade para cada ponto usando a equação:

$$\frac{(y_i/x_i)}{(y_i/x_i)_m} \times 100\% \quad (6.5)$$

De seguida, é traçado o gráfico de modo a avaliar o seu comportamento linear, ao valor médio é atribuído um valor de 100%, isto é, indicando a linearidade perfeita. De modo a garantir a linearidade do método, cada ponto de calibração deve estar entre 90% e 110%. Caso existam valores fora deste intervalo esses valores devem ser rejeitados e o gráfico é realizado novamente até que se comprove a linearidade (Silva, 2010; RELACRE, 2000).

6.2. Limiares analíticos

Os conceitos de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) são de extrema importância para a validação de um método, uma vez que permitem que sejam traçados limites analíticos possíveis de alcançar com o método a utilizar, uma vez que indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar o analito que se quer analisar. Deste modo, tratam-se dos limites inferiores da curva de calibração, que correspondem a baixos níveis de concentração (Martins, 2016; RELACRE, 2000).

6.2.1. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) define-se como o teor mínimo que é possível detectar a presença do analito com uma certa confiança estatística. Em termos qualitativos, o limite de detecção corresponde ao início do intervalo em que é possível distinguir o sinal do branco do sinal da amostra, indicando se o analito está presente ou ausente, ou seja, a mais pequena quantidade de analito presente numa amostra (LD) pode ser detetada estatisticamente, mas não tem de ser quantificada com um valor exato. É importante salientar, que uma leitura que seja inferior ao limite de detecção não significa que o analito esteja ausente, apenas indica que a concentração do composto em causa é inferior a um certo valor (Ferreira, 2010; Silva, 2010; RELACRE, 2000).

Para uma correta definição do limite de detecção é necessário introduzir dois conceitos de estatística: erro tipo I (risco α) e o erro tipo II (risco β). O erro tipo I, diz respeito à probabilidade de confirmar a presença do analito em estudo numa amostra quando na verdade não está presente e o erro tipo II, caracterizado como a probabilidade de confirmar a ausência do analito em estudo quando na verdade está presente. Estes dois tipos de erros devem ser minimizados de modo a se conseguir uma correta análise destes limiares analíticos, usando-se as recomendações da IUPAC, ou seja, $\alpha = \beta = 5\%$ (RELACRE, 2000).

Quando o método analítico envolve a utilização da curva de calibração, o limite de detecção é calculado através do desvio padrão residual da curva pela equação:

$$LD = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{b} \quad (6.6)$$

Onde, 3,3 corresponde ao valor de K, um fator numérico para o nível de confiança que neste caso é de 99,7%; $S_{y/x}$, corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e b corresponde ao declive da reta de calibração (Silva, 2010; RELACRE, 2000).

6.2.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração a partir da qual é possível a quantificação do analito com uma determinada precisão e exatidão. Em termos práticos, corresponde ao padrão de calibração com menor concentração. Este limiar, após ser determinado, deve ser testado para averiguar se a precisão e exatidão conseguida é satisfatória, recorrendo a padrões internos em condições de precisão intermédia cuja concentração é próxima ou igual ao limiar de quantificação (Martins, 2016; RELACRE, 2000).

Quando o método envolve a utilização da curva de calibração, o limite de quantificação é calculado através de uma equação semelhante à mencionada para determinar o limite de deteção, como demonstrado na equação abaixo, contudo, o valor de K neste limite é de 10, o que significa que o desvio padrão relativo não deve exceder os 10% (RELACRE, 2000).

$$LQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b} \quad (6.7)$$

Embora o limite de quantificação esteja definido no método, sempre que ocorrem alterações na rotina do método torna-se necessário proceder à atualização dos limites experimentais. Assim, como actualização de ambos os limiares analíticos (LD e LQ) deverá ser efetuada sempre que ocorram alterações de fatores de influência (como analista, reagentes, equipamento, entre outros), tal como, sempre que se realizar uma nova curva de calibração e se utilize os dados da mesma para o cálculo dos limiares. Poderá ser realizado um estudo ao longo do tempo de modo a se poder adotar como limiares analíticos a média aritmética dos limites de deteção e quantificação de uma série significativa de curvas, desde que se observe estabilidade nos valores dos limiares (RELACRE, 2000).

6.3. Sensibilidade

A sensibilidade de um método relaciona-se com a variação mínima que é necessário impor à grandeza a medir (concentração) para se obter uma variação significativa do resultado da medição (sinal). Deste modo, um método será considerado sensível se pequenas variações na concentração do analito (x) derem origem a variações no sinal medido (y). A sensibilidade é definida pelo declive da reta de calibração, logo, se o modelo de regressão é linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao seu declive (Francisco, 2008).

O relativismo da sensibilidade faz dela um parâmetro interessante, isto é, quando se pretende averiguar a sua evolução ao longo do tempo, quando se compara a sensibilidade de vários

métodos analíticos baseados em modelos lineares para o mesmo analito e quando se compara a sensibilidade para vários analitos (RELACRE, 2000).

Embora relacionados entre si, este conceito de sensibilidade, associado à magnitude do sinal, não deve ser confundido com o limite de deteção, associado à capacidade de resolução do sinal (Francisco, 2008; RELACRE, 2000).

6.4. Precisão

A precisão é um dos parâmetros principais na validação dos métodos, pois determina a sua aceitação. Expressa o grau de concordância dos resultados entre dois ensaios independentes sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, contudo é preferível estudar a precisão em amostras reais de modo a minimizar o efeito de matriz. Deste modo, a precisão pode ser avaliada através do estudo da repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia. São geralmente expressas pelo desvio padrão (σ) e pelo coeficiente de variação (CV) das respostas obtidas para uma mesma concentração (Ferreira, 2010; Martins, 2016).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad (6.8)$$

$$\% CV = 100 \times \frac{\sigma}{\bar{y}} \quad (6.9)$$

Onde, \bar{y} representa a média aritmética dos resultados obtidos, y_i representa os valores das áreas dos picos e dos tempos de retenção e n representa o número total de medições.

6.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade corresponde à precisão de resultados obtidos por medições repetidas efetuadas usando a mesma amostra num curto intervalo de tempo sobre as mesmas condições experimentais, tais como: a utilização do mesmo laboratório, o mesmo analista, os mesmos equipamentos, assim como os mesmos reagentes. Permite avaliar a variabilidade que ocorre num curto espaço de tempo e é geralmente usada para estimar as diferenças prováveis entre resultados de réplicas obtidas durante a análise de uma série analítica ou de um mesmo lote (Ferreira, 2010; RELACRE, 2000).

Para a determinação da repetibilidade são utilizadas no mínimo 10 amostras em condições de repetibilidade. Esta, é dada pelo desvio padrão associado à média dos resultados obtidos e indica se a diferença entre análises é significativa em termos de repetibilidade. O limite de repetibilidade (r) corresponde ao valor máximo permitido para a diferença absoluta entre dois ensaios (X_i, X_{i-1}) em condições de repetibilidade, calculada para um nível de confiança de 95%. Experimentalmente, se a amplitude entre dois ensaios sucessivos for igual ou inferior ao limite de repetibilidade os resultados são aceites, caso contrário deverá ser feita uma análise crítica, e, se necessários realizar a repetição dos ensaios (Bressole, 1996; Martins, 2016; RELACRE, 2000).

O limite de repetibilidade (r) é dado pela equação:

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (6.10)$$

Onde, S_{ri} corresponde ao desvio padrão da repetibilidade dos resultados obtidos.

6.4.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade caracteriza-se como a precisão de um método de ensaio sobre condições experimentais diferentes, isto é, diferentes laboratórios, diferentes analistas, diferentes equipamentos e intervalos de tempo diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, numa mesma amostra. É um método de análise avaliado através de ensaios interlaboratoriais (Ferreira, 2010; Silva, 2010).

Define-se o limite de reprodutibilidade (R), como o valor máximo admissível para a diferença absoluta entre ensaios em condições de reprodutibilidade, determinada para o nível de confiança de 95% de acordo com a equação:

$$R = 2,8 \times \sqrt{S_{Ri}^2} \quad (6.11)$$

Onde, S_{Ri} corresponde ao desvio padrão da reprodutibilidade associada aos resultados obtidos.

6.4.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia expressa a precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente as condições a variar. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a interferência que a mudança de certas condições intralaboratoriais, como diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes dias de análise podem ter no resultado final. Esta medida

de precisão, é reconhecida como a mais representativa da variabilidade de resultados num laboratório e, como tal, é a mais aconselhável de usar (Ferreira, 2010; RELACRE, 2000).

6.5. Exatidão

A exatidão de um método define-se como sendo a capacidade de um método analítico em dar resultados o mais próximo possível do valor real. A ICH define exatidão como o grau de concordância entre o valor obtido num ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é um valor obtido por uma medição perfeita, e este valor é, por natureza, indeterminado (Francisco, 2008; Ribani et al., 2004).

A exatidão está condicionada pela existência de erros sistemáticos, erros que se manifestam sempre da mesma forma para um dado conjunto de ensaios independentes levando ao aparecimento de resultados significativamente afastados do seu valor verdadeiro, e erros aleatórios. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: os materiais de referência, a comparação de métodos, ensaios interlaboratoriais e a realização de ensaios de recuperação, sendo, este último o mais utilizado na empresa (Ribani et al., 2004; Ferreira, 2010).

Segundo ICH, a exatidão deverá ser avaliada através de um mínimo de nove determinações em conjunto com as percentagens de recuperação, sendo que devem ser adicionadas às amostras pelo menos três diferentes concentrações cobrindo a gama de trabalho.

A recuperação está relacionada com a exatidão uma vez que indica a quantidade de um certo analito recuperado no processo em relação à quantidade real presente na amostra. O estudo da recuperação consiste na adição de uma quantidade conhecida do analito que se está a estudar, seguida da sua extração e quantificação de maneira a verificar a percentagem de recuperação (Ferreira, 2010; Ribani et al., 2004).

A percentagem de recuperação é calculada pela equação:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{C_{\text{Nom}} - C_{\text{Obs}}}{C_{\text{Nom}}} \times 100 \quad (6.12)$$

Onde, C_{Nom} corresponde à concentração normal ou teórica e C_{Obs} corresponde à concentração observada, sendo esta última representa a média aritmética das determinações efetuadas (x) obtida através da introdução das respostas/áreas cromatográficas (y) na equação da curva de calibração (Francisco, 2008).

7. Metodologia Experimental

A realização da implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico em produtos de padaria e pastelaria por HLPC (*High Performance liquid chromatography*) foi realizada no Laboratório de Química da SGS Portugal, situado em Lisboa.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica, foram realizadas inúmeras experiências preliminares de modo a serem obtidas as condições mais adequadas e favoráveis para a validação do método.

Neste capítulo são descritos os reagentes, materiais e equipamentos para a metodologia experimental e a descrição do processo.

7.1. Amostras

7.1.1. Amostras para validação do método

Tendo em conta que a validação do método era em produtos de padaria e pastelaria, foram escolhidos amostras de pão de forma fatiado embalado e bolo de arroz, sendo que o primeiro foi obtido numa grande superfície em Lisboa e o último foi fornecido pela empresa.

7.1.2. Recolha de amostras no mercado

Tendo por base a realização de uma análise mais completa do ácido propiónico em produtos da padaria, foram recolhidas três amostras numa grande superfície comercial. Por razões de confidencialidade não serão apresentadas as marcas em questão e as amostras serão sempre identificadas com um código. Assim, na Tabela 7.1 encontram-se as diferentes amostras usadas, assim, como o tipo comercial e a sua composição.

Tabela 7.1 – Diferentes amostras estudadas.

| Amostra | Tipo comercial | Composição |
|----------------|-----------------------|-------------------|
| A | Marca própria | Pão de trigo |
| B | Marca 1 | Pão de trigo |
| C | Marca 2 | Pão de trigo |

7.2. Reagentes e Preparação de soluções

Para preparar a fase móvel foi utilizado 1,15 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) da SIGMA - ALDRICH, pesado numa balança analítica Mettler Toledo ($d= 0,0001$) e 30 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) dissolvido em água ultra pura ou Mili-Q da Milipore, para balão volumétrico de 1 L. A fase móvel B, é constituída apenas por acetonitrilo (ACN) para HPLC da Sigma- Aldrich. Estas servem como eluente, pois separa os componentes da amostra ao longo da fase estacionária, dependendo da afinidade destes para com a coluna.

A fase móvel A, foi previamente filtrada e levada a um banho de ultra-sons antes de ser colocada no HPLC.

Para preparar a solução stock foi usado 200 mg de padrão ácido propiónico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$) da EMD Milipore Corporation diluído em água ultra pura, num balão volumétrico de 200 mL, obtendo-se uma solução padrão de 1000 mg/L.

A curva de calibração é fundamental no processo de quantificação por HPLC, uma vez que em conjunto com a concentração dos padrões e as suas respectivas áreas dos picos vai originar uma equação, designada por equação da reta, que será usada para calcular o teor de ácido propiónico nas amostras (mg/L). Deste modo, para a sua elaboração foram preparadas cinco soluções padrão de ácido propiónico com as concentrações 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 400,0 mg/L em balões de 50 mL a partir da solução padrão preparada anteriormente. Na Tabela 7.2 encontram-se os volumes utilizados para as respetivas concentrações da curva de calibração. Na Figura 7.2 encontram-se os padrões e os seus respetivos vials.

Tabela 7.2 - Curva de calibração.

| | Padrão (mg/kg) | Volume do padrão (mL) |
|-----------------|-----------------------|------------------------------|
| Padrão 1 | 25,0 | 1,25 |
| Padrão 2 | 50,0 | 2,50 |
| Padrão 3 | 100,0 | 5,00 |
| Padrão 4 | 200,0 | 10,0 |
| Padrão 5 | 400,0 | 20,0 |



Figura 7.1 - Solução padrão (P1 – P5) e seus respectivos vials.

7.3. Método a validar

7.3.1. Padaria e Pastelaria

Em primeiro lugar, o pão e o bolo de arroz foram moídos, num moinho Retch, de modo a tornar mais fácil o processo de extração do ácido propiónico das amostras. De seguida, pesou-se 1 g da amostra moída, numa balança analítica Mettler Toledo ($d= 0,0001$), para um copo de 100 mL previamente identificado, onde foi, seguidamente adicionado 10 mL de água ultra pura e tapou-se com papel de alumínio.

Posteriormente, levou-se o copo a um banho de ultra-sons Sonorex cerca de 10 minutos de modo a ocorrer uma correcta dissolução do ácido propiónico presente na amostra. Seguidamente, foi passado o conteúdo do copo para um tubo de falcon de 15 mL, e levou-se o falcon a centrifugar (Figura 7.2), numa centrifuga HERMLE, durante cerca de 10 minutos a 4000 rpm, podendo ser observado na Figura 7.3 o resultado da extração do método.

Por fim, e após a centrifugação, com uma pipeta de Pasteur retirou-se parte do sobrenadante para um vial de 1 mL e injetou-se no HPLC.



Figura 7.2 - Operação de centrifugação das amostras numa centrifuga HERMLE.

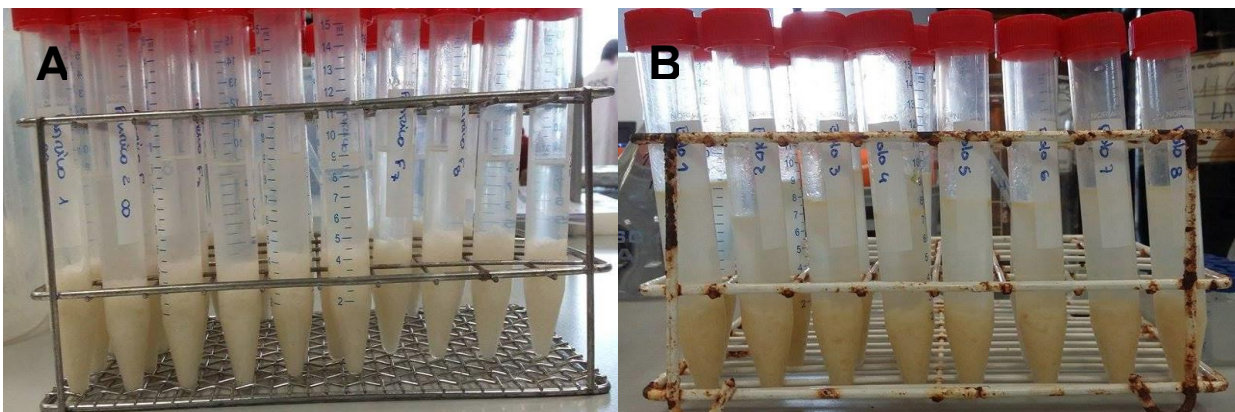


Figura 7.3 - Sobrenadante resultante do processo de centrifugação (A) Sobrenadante do pão; (B) Sobrenadante do bolo.

7.3.2. Condições cromatográficas

Para a quantificação do ácido propiónico, nas amostras de padaria e pastelaria em estudo, utilizou-se o equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eluição isocrática, com detetor UV, injeção automática e sistema de aquisição de dados, da marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity. As condições cromatográficas utilizadas são apresentadas na Tabela 7.3.

Tabela 7.3 - Condições Cromatográficas.

| | |
|-----------------------------|--|
| Pré-coluna | Fase reversa: 12,5 mm x 4,6 mm Tamanho de partículas: 5 µm Marca: Teknokroma BRISA LC2 C18 |
| Coluna | Fase reversa: 250 mm x 4,6 mm Tamanho de partículas: 5 µm Marca: Teknokroma BRISA LC2 C18 |
| Detector | UV-Vísivel Emissão: 443 nm Excitação: 333 nm |
| Temperatura do forno | Temperatura ambiente ± 25 °C |
| Bomba / Fluxo | 1 mL/min. |
| Volume de injeção | 25 µL |
| Tempo de corrida | 15 minutos |
| Fase móvel | 90% Fase móvel A (Tampão Na ₂ SO ₄ + 30µL H ₂ SO ₄) 10% Fase móvel B (ACN) |

7.3.3. Quantificação de ácido propiónico por HPLC

De modo a quantificar a amostra quanto ao seu teor de ácido propiónico em mg/L, foram preparados e injetados no HPLC padrões para a curva de calibração a fim de se obter uma equação da reta, representada na seguinte equação:

$$Y = ax + b \quad (7.2)$$

Sendo que **y** representa a área do pico, **a** o declive da reta, **x** a concentração de ácido propiónico na amostra e **b** a ordenada na origem. A equação da reta mostra, assim, a relação entre o valor de **x** (concentração de ácido propiónico) e a medida de **y** (área do pico).

De modo a se considerar os dados obtidos válidos deve verificar-se o valor de R² (coeficiente de correlação), que deverá ser o mais próximo possível de 1, uma vez que quanto mais próximo de 1 menor será o valor do desvio padrão residual e, conseqüentemente, menor será a incerteza associada ao resultado final do método. Valores abaixo de 0,995 (valor mínimo aceite) é recomendável que a análise seja realizada novamente (Mesquita, 2013; RELACRE, 2000).

Para cada análise realizada foi necessário fortificar uma amostra. O procedimento é realizado do mesmo modo das restantes amostras, sendo esta sujeita à adição de uma quantidade de solução stock de concentração conhecida. A quantidade de stock adicionada é determinada de forma a garantir que a amostra fortificada se encontre sempre dentro da curva de calibração. Posto isto, foi adicionado 1 mL de solução stock (200 mg/L) à amostra de pão e à amostra de

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

bolo, no início do procedimento, de modo a que alíquota final a ser injetada no HPLC apresentasse uma fortificação de 100 mg/L de ácido propiónico. No caso da massa de ácido propiónico na amostra cair fora da gama da reta de calibração ajusta-se a quantidade injetada, diluindo essa fração de amostra.

8. Resultados e Discussão

De acordo com o Guia RELACRE 13, e sendo este método um método quantitativo, pode dizer-se que foram tratados todos os requisitos analíticos necessários para a validação do mesmo. Uma vez que o método se realizou com amostras distintas e as condições cromatográficas foram iguais, foi necessário realizar uma curva de calibração que abrangesse ambos os produtos alimentares, permitindo analisar ambas as amostras simultaneamente.

8.1. Curva de calibração

8.1.1. Gama de trabalho

Após o estudo de qual seria a gama de trabalho mais adequada para o método de quantificação de ácido propiónico em alimentos, chegou-se às seguintes concentrações de padrões: 25,0 ; 50,0 ; 100,0 ; 200,0 e 400,0 mg/L. Na Tabela 8.1 encontram-se representado os valores das concentrações dos padrões e respectivas áreas cromatográficas referentes à área do pico/sinal dado pelo HPLC, que deram origem à reta de calibração, Figura 8.1, em baixo ilustrada.

Tabela 8.1 - Padrões das curvas de calibração e seus respectivos sinais cromatográficos referentes ao dia 1 e 2.

| Concentração (mg/L) | Área do pico |
|---------------------|--------------|
| 0,0 | 0,0 |
| 25,0 | 20,6 |
| 50,0 | 41,5 |
| 100,0 | 85,7 |
| 200,0 | 172,5 |
| 400,0 | 346,7 |

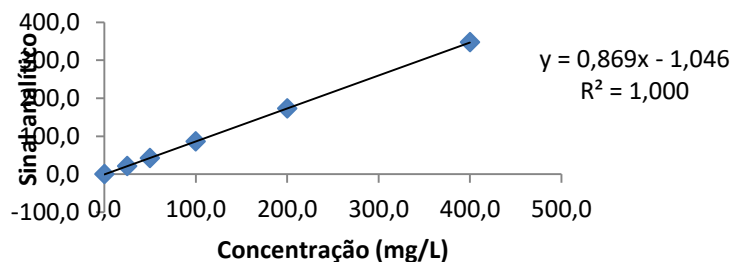


Figura 8.1 - Curva de calibração do ácido propiónico na gama de concentrações de 25,0 a 400,0 mg/L.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

Segundo figura 8.1 o coeficiente de correlação (R^2) foi de 1,000 na gama de concentrações de ácido propiónico de 25,0 a 400,0 mg/L. Para se validar os dados obtidos, o valor de R^2 deverá ser o mais próximo possível de 1, pois, quanto mais próximo de 1 menor será o valor do desvio padrão residual e menor será a incerteza associada ao resultado final do método (Mesquita, 2013; RELACRE, 2000).

No sentido de se poder avaliar a gama de trabalho foi realizado o teste de homogeneidade de variâncias, onde foi analisado 10 vezes o primeiro padrão (25,0 mg/L) e 10 vezes o último padrão (400,0 mg/L). Nas Figuras 8.2 e 8.3 estão representados os cromatogramas obtidos para os padrões 25,0 e 400,0 mg/L, respetivamente.

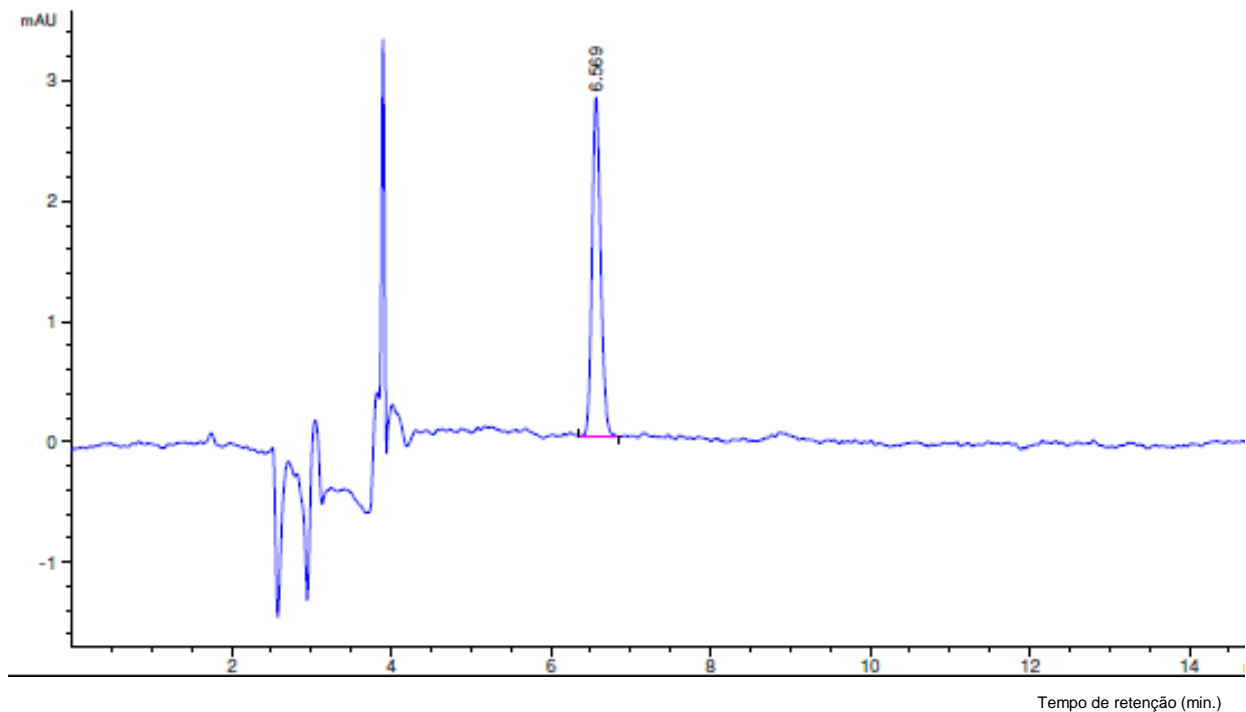


Figura 8.2 - Cromatograma correspondente ao padrão 25,0 mg/L.

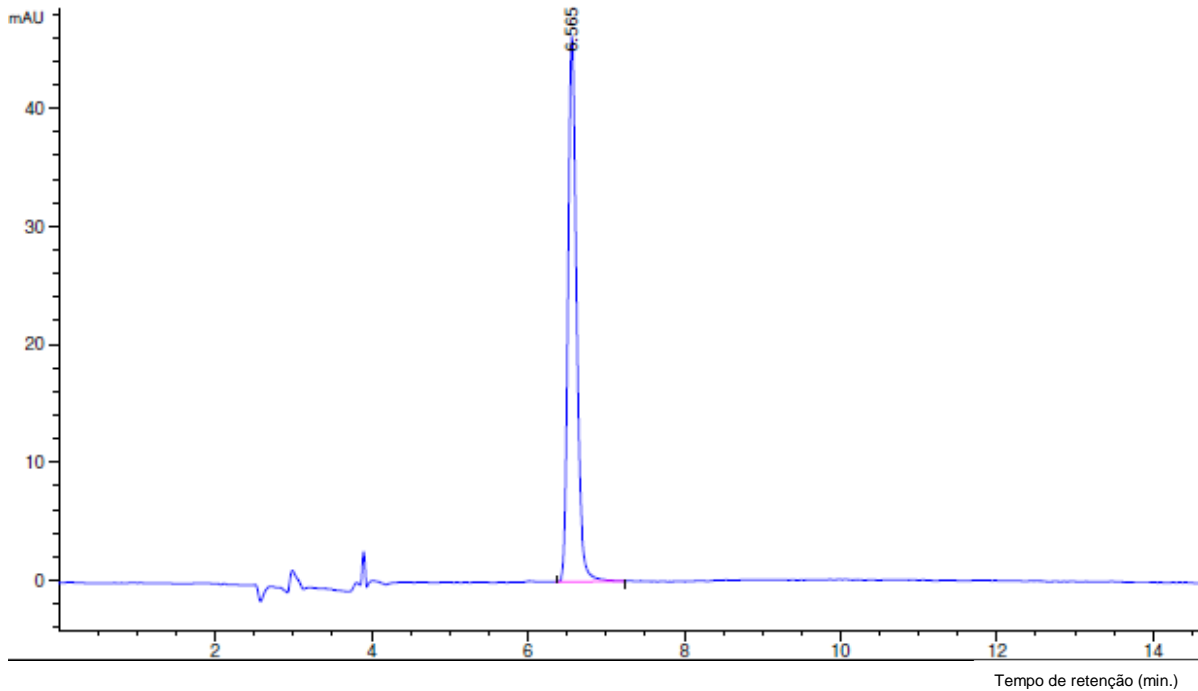


Figura 8.3 - Cromatograma correspondente ao padrão 400,0 mg/L.

Os cromatogramas obtidos fornecem os valores de área do pico e do tempo de retenção relativo ao analito em estudo, neste caso, ácido propiónico, sendo o tempo de retenção de 6,565 minutos e a área de 20,6 e de 346,7 para o padrão de 25,0 mg/L e 400,0 mg/L, respectivamente.

Os resultados representados na Tabela 8.2 foram usados para calcular as variâncias associadas ao primeiro e último padrão, utilizando as equações (6.1) e (6.2).

Tabela 8.2 - Áreas dos picos, média, desvio padrão e variâncias dos padrões 25,0 e 400,0 mg/L.

| Áreas dos picos cromatográficos | | |
|--|-------------------------|--------------------------|
| | Padrão 25,0 mg/L | Padrão 400,0 mg/L |
| | 20,6 | 346,7 |
| | 21,0 | 347,5 |
| | 20,3 | 350,5 |
| | 21,1 | 346,8 |
| | 20,5 | 346,5 |
| | 21,2 | 350,9 |
| | 20,8 | 348,9 |
| | 20,8 | 346,9 |
| | 21,5 | 347,6 |
| | 21,8 | 348,6 |
| Média | 21,0 | 348,1 |
| Desvio padrão | 0,5 | 1,6 |
| Variância | 0,19 | 2,3 |

De modo a avaliar as variâncias foi calculado o PG pela equação (6.3), obtendo-se um PG igual a 1,21. Para verificar a existência de diferenças significativas entre as variâncias comparou-se o valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher, para um intervalo de confiança de 99% e para (n - 1) graus de liberdade, que neste caso é igual a 9. Sabendo que o valor tabelado é de 5,35 pode-se concluir que o resultado de PG foi inferior ao valor crítico (F), logo, não existem diferenças significativas entre as variâncias, sendo a gama de trabalho utilizada ajustada e adequada para o método.

Outro ponto avaliado de modo a investigar se este era adequado para a determinação de ácido propiónico foi o sistema cromatográfico. Para tal, foram usados os resultados fornecidos pela homogeneidade de variâncias a fim de se determinar o coeficiente de variação (CV %). Os resultados são apresentados na Tabela 8.3.

Tabela 8.3 - Análise da adequação ao sistema cromatográfico para primeiro padrão (25,0 mg/L).

| | Área do pico | Tempo de retenção |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| | 20,6 | 6,569 |
| | 21,0 | 6,567 |
| | 20,3 | 6,568 |
| | 21,1 | 6,569 |
| | 20,5 | 6,571 |
| Média | 20,7 | 6,569 |
| Desvio padrão | 0,3 | 0,001 |
| Coeficiente de variação (CV %) | 1,5 | 0,02 |

Tendo o coeficiente de variação um valor inferior a 5% para a área do pico, e o coeficiente de variação para o tempo de retenção ser inferior a 2%, critérios internos da empresa, considerou-se o sistema cromatográfico adequado para a análise do ácido propiónico.

8.1.2. Linearidade

Através do estudo da reta de calibração sabe-se que o coeficiente de correlação é aceitável, contudo não comprova a linearidade da reta. Normalmente o estudo da linearidade da reta de calibração em cromatografia é realizado de acordo com o teste RIKILT, uma vez que este permite avaliar a linearidade através do estudo dos resíduos. Para tal, foi utilizada a equação (6.5), obtendo-se os resultados na Tabela 8.4.

Tabela 8.4 - Cálculo dos resíduos para o estudo da linearidade.

| n | X _i | Y _i | (Y _i / X _i) | (Y _i / X _i) / (Y _i / X _i) _m (%) |
|---|----------------|----------------|------------------------------------|---|
| 1 | 25,0 | 20,6 | 0,82 | 97 |
| 2 | 50,0 | 41,5 | 0,83 | 98 |
| 3 | 100,0 | 85,7 | 0,86 | 101 |
| 4 | 200,0 | 172,5 | 0,86 | 102 |
| 5 | 400,0 | 346,7 | 0,87 | 102 |
| Média Y_i / X_i)_m | | 0,85 | | |

De acordo com os valores da Tabela 8.4 foi criado um gráfico (Figura 8.4), onde o eixo das abcissas corresponde às concentrações do analito e o eixo das ordenadas aos valores das percentagens calculadas.

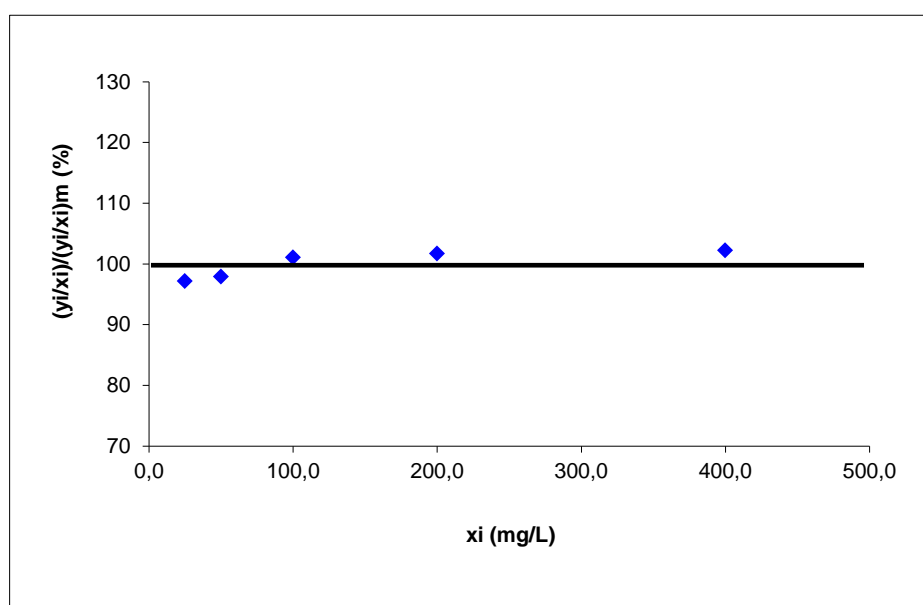


Figura 8.4 - Teste de RIKILT para avaliação a linearidade do método.

A condição de linearidade deste método observa-se caso os valores do teste de RIKILT se situem entre os 90% e os 110%. Através do gráfico, representado na Figura 8.4, verifica-se então a linearidade do método, sendo a função de calibração linear.

8.2. Limiares analíticos

Os limites de deteção e de quantificação são parâmetros importantes, pois, indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar, respetivamente, a substância em análise.

Para calcular o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear, os limites são calculados através do declive da reta, (Figura 8.1) e do desvio padrão residual de acordo com as equações (6.6) e (6.7), sendo que o limite de quantificação corresponde ao primeiro ponto da curva de calibração, sendo confirmado no início de cada análise através da equação (6.7).

Na Tabela 8.5 encontram-se representados os limites de detecção e de quantificação teóricos obtidos para o método em estudo, calculados através de parâmetros da reta de regressão linear.

Tabela 8.5 - Valor do limite de detecção e de quantificação calculado para a determinação do ácido propiónico.

| Declive da reta (b) | Desvio padrão residual $S_{y/x}$ | Limite de detecção (LD) | Limite de quantificação (LQ) |
|---------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 0,869 | 0,709 | 2,7 mg/L | 8,2 mg/L |

8.3. Precisão

Para estudar este parâmetro, foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermédia.

8.3.1. Repetibilidade

Este ensaio consiste em repetir o mesmo ensaio, sobre a mesma amostra, pelo mesmo analista, mesmo equipamento e mesmos reagentes num curto intervalo de tempo. Para determinar a repetibilidade do método, para amostras de pão de forma e bolo de arroz, foram efetuadas 10 repetições de cada matriz e calculada a concentração de analito presente, o respetivo valor médio, o desvio padrão, limite de repetibilidade, repetibilidade (%) e o coeficiente de variação. Tendo em conta que a repetibilidade na matriz de pastelaria foi analisada num dia diferente do que a repetibilidade na matriz de padaria, foram preparadas curvas de calibração diferentes, resultando em $y = 0,869x - 1,046$ para o pão de forma, e $y = 0,851x + 0,397$ para o bolo de arroz. A determinação da concentração de analito (mg/kg) nas matrizes em estudo foi realizada de acordo com a equação 7.3. Os resultados obtidos para a matriz de padaria e pastelaria podem, então, ser observados na Tabela 8.6 e 8.7, respetivamente.

Tabela 8.6 - Avaliação da repetibilidade obtidos para pão de forma.

| Tipo de amostra | Concentração (mg/kg) |
|--|-----------------------------|
| Pão de forma | 2247,0 |
| | 2258,2 |
| | 2257,4 |
| | 2253,0 |
| | 2224,4 |
| | 2255,9 |
| | 2206,4 |
| | 2251,1 |
| | 2232,6 |
| | 2279,1 |
| Média | 2246,5 |
| Desvio padrão | 20,4 |
| Nº de medições | 10 |
| Limite de repetibilidade | 57,2 |
| Repetibilidade (%) | 2,55 |
| Coefficiente de variação (CV %) | 0,91 |

Tabela 8.7 - Avaliação da repetibilidade obtidos para o bolo de arroz.

| Tipo de amostra | Concentração (mg/kg) |
|--|-----------------------------|
| Bolo de arroz | 434,9 |
| | 446,4 |
| | 415,4 |
| | 409,3 |
| | 400,7 |
| | 432,5 |
| | 398,7 |
| | 418,5 |
| | 428,0 |
| | 399,1 |
| Média | 418,3 |
| Desvio padrão | 16,7 |
| Nº de medições | 10 |
| Limite de repetibilidade | 46,8 |
| Repetibilidade (%) | 11,2 |
| Coefficiente de variação (CV %) | 4,0 |

Analisando-se ambas as Tabelas (8.6 e 8.7), pode-se concluir que se obteve um limite de repetibilidade de 57,2 mg/kg e 46,8 mg/kg para o pão e o bolo, respetivamente com um nível de confiança de 95%.

Para validar o método em termos de repetibilidade o coeficiente de variação (CV %) deve ser inferior a 5,0%. De acordo com os dados da Tabela 8.5 e da Tabela 8.6, verifica-se que para ambas as amostras este requisito foi atingido, sendo de 0,91% para a amostra de pão e 4,0% para o bolo. O facto do coeficiente de variação ser superior no bolo deve-se à diferente composição das matrizes.

8.3.2. Precisão intermédia

De modo a determinar a precisão intermédia do método, foram aproveitadas as 10 medições da repetibilidade, de cada matriz, e, num outro dia foi repetido o ensaio, com o mesmo analista, realizando mais 5 determinações. Ou seja, a condição que variou neste parâmetro foi o dia de análise. Como tal, foi necessário preparar novas curvas de calibração, resultando em $y = 0,870x - 1,540$ para a amostra de pão e em $y = 0,848x + 1,446$ para o bolo. Os resultados desta análise para ambas as matrizes podem ser observadas na Tabela 8.8.

Tabela 8.8 - Avaliação da precisão intermédia para as matrizes em estudo em dias diferentes.

| Amostra | Concentração (mg/kg) | Amostra | Concentração (mg/kg) |
|--|-----------------------------|---|-----------------------------|
| Pão de forma 1º dia (9/2/2017) | 2247,0 | Bolo de arroz 1º dia (26/4/2017) | 434,9 |
| | 2258,2 | | 446,4 |
| | 2257,4 | | 415,4 |
| | 2253,0 | | 409,3 |
| | 2224,4 | | 400,7 |
| | 2255,9 | | 432,5 |
| | 2206,4 | | 398,7 |
| | 2251,1 | | 418,5 |
| | 2232,6 | | 428,0 |
| 2279,1 | 399,1 | | |
| Pão de forma 2º dia (10/2/2017) | 2282,0 | Bolo de arroz 2º dia (5/5/2017) | 424,8 |
| | 2261,5 | | 433,0 |
| | 2280,7 | | 413,9 |
| | 2263,8 | | 405,4 |
| | 2277,7 | | 439,8 |
| Média | 2255,4 | Média | 420,0 |
| Desvio padrão | 21,5 | Desvio padrão | 15,5 |
| Nº de medições | 15 | Nº de medições | 15 |
| Precisão intermédia | 60,3 | Precisão intermédia | 43,49 |
| Precisão intermédia (%) | 2,68 | Precisão intermédia (%) | 10,3 |
| CV (%) | 0,96 | CV (%) | 3,7 |

A análise da precisão intermédia é considerada validada se o coeficiente de variação (CV %) for inferior a 5,0%. De acordo com os resultados obtidos na Tabela 8.8 verificou-se que o CV (%) para o pão foi de 0,96% e para o bolo foi de 3,7%, pelo que foram inferiores ao critério exigido, e pode então concluir-se que o método é válido para a precisão intermédia.

Tanto na repetibilidade como na precisão intermédia, o CV (%) obtido no bolo foi superior ao que foi obtido no pão. Isto pode dever-se ao fato de a amostra de bolo quando foi analisada já ter passado ligeiramente da validade.

8.4. Exatidão

De modo a avaliar a exatidão do método foram realizados vinte e quatro ensaios de recuperação com a fortificação de 100 ppm, realizados com duas amostras de diferentes concentrações. Tendo em conta que este parâmetro foi avaliado em dias diferentes, foi necessário preparar uma nova curva de calibração para a amostra do bolo de arroz, sendo a equação da reta $y = 0,855x + 0,029$. De notar que a curva de calibração para a amostra de pão foi a usada na repetibilidade para a mesma amostra.

Nas Figuras 8.5 e 8.6 estão representados os cromatogramas para a amostra de pão não fortificada e fortificada, respetivamente.

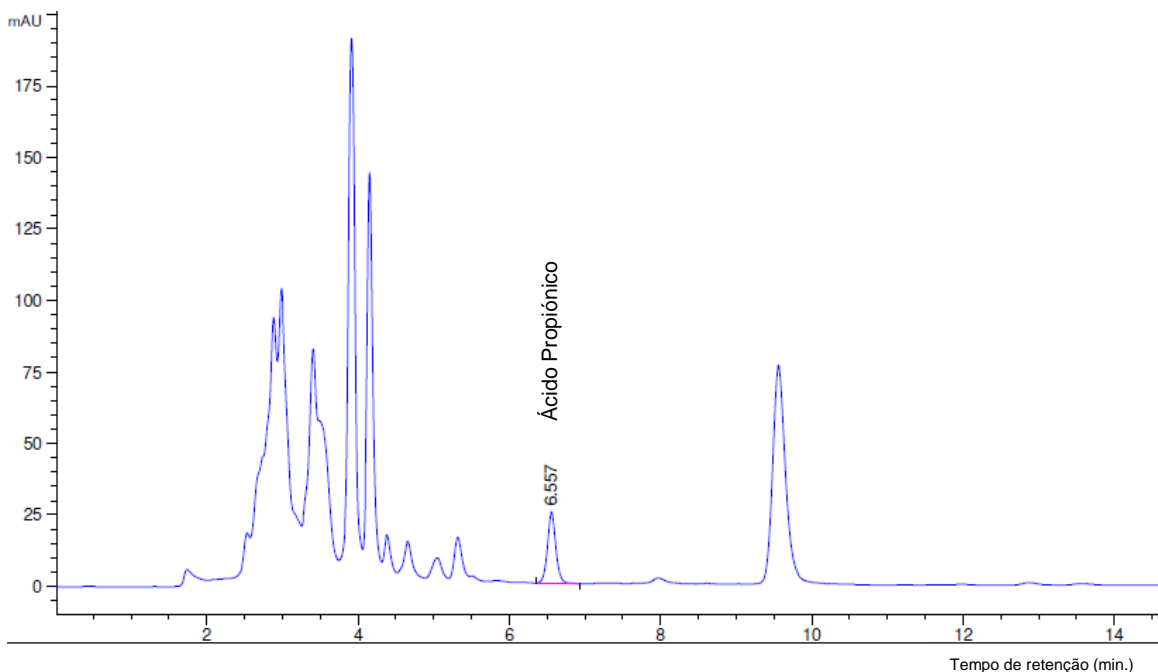


Figura 8.5 - Cromatograma referente à amostra de pão não fortificada.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

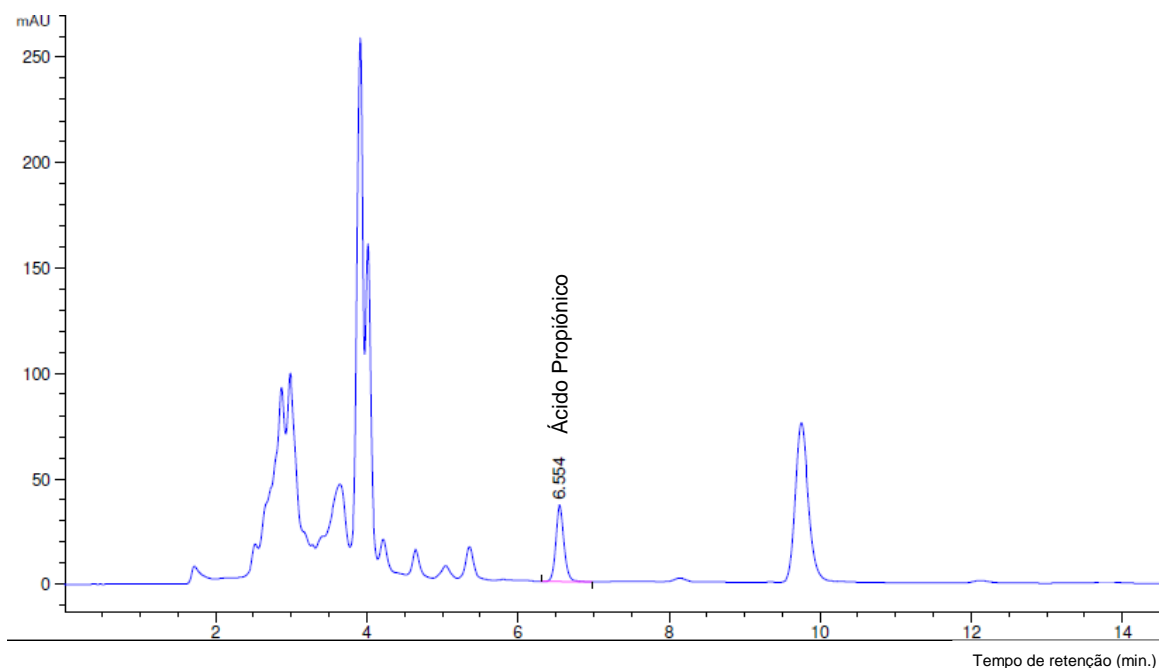


Figura 8.6 - Cromatograma referente à amostra de pão fortificada com 1 mL de stock de ácido propiónico.

De acordo com os cromatogramas verificou-se a presença de ácido propiónico para a amostra de pão não fortificada (Figura 8.5) obtendo-se um tempo de retenção de 6,557 minutos, um pico cromatográfico com uma área de 195,7 e uma concentração de 2247,0 mg/kg. Já na amostra fortificada, com a adição de 1 mL de solução stock de ácido propiónico observa-se um tempo de retenção de 6,554 minutos, um pico cromatográfico com uma área de 277,5 e uma concentração de 3181,2 mg/kg.

Para a amostra de bolo de arroz o procedimento foi o mesmo, obtendo-se os cromatogramas apresentados nas Figuras 8.7 e 8.8 para os ensaios não fortificado e fortificado, respetivamente.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

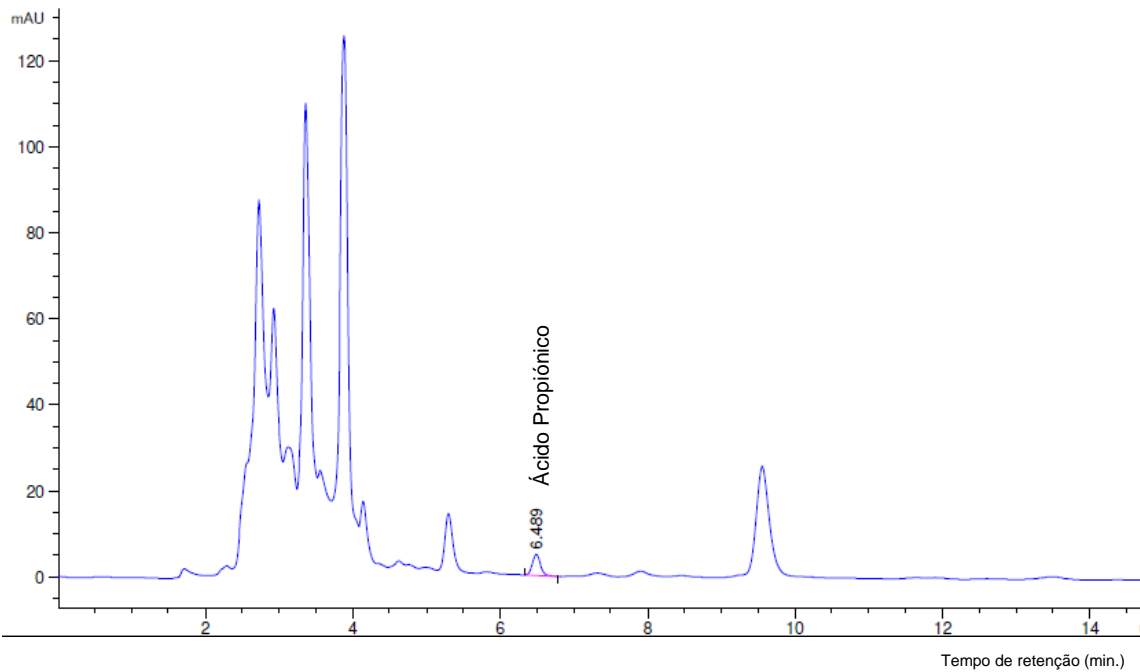


Figura 8.7 - Cromatograma referente à amostra de bolo não fortificada.

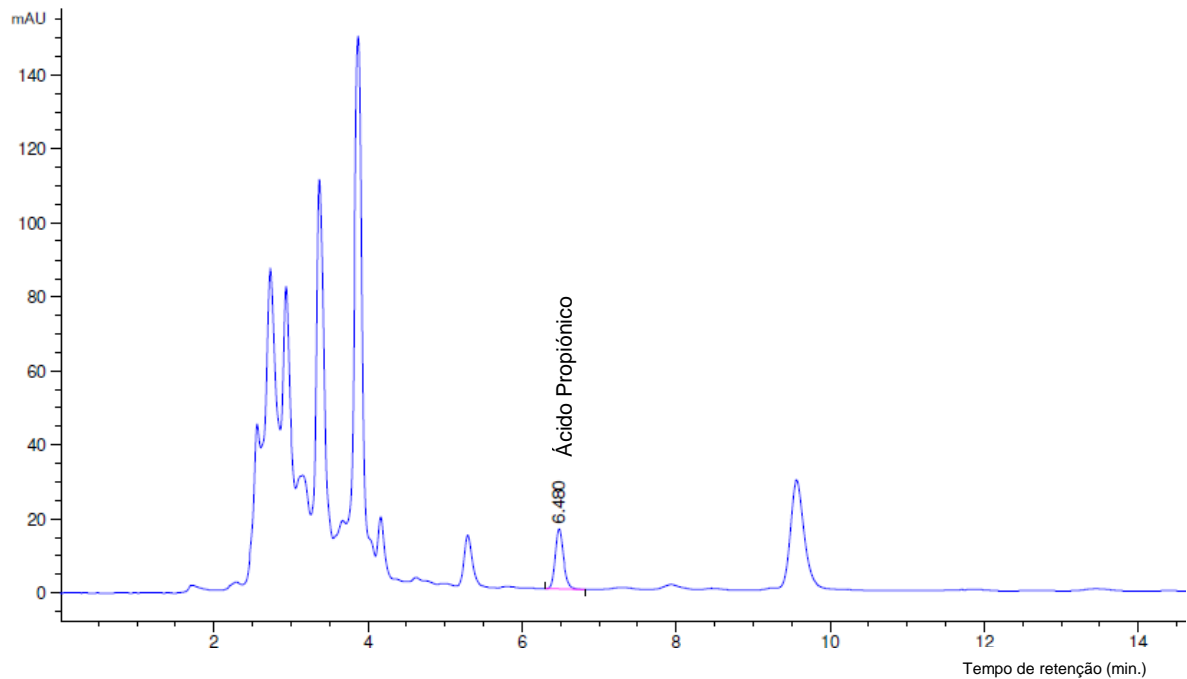


Figura 8.8 - Cromatograma referente à amostra de bolo fortificada com 1 mL de stock

De acordo com os cromatogramas verificou-se a presença de ácido propiónico para a amostra de bolo não fortificada (Figura 8.7) obtendo-se um tempo de retenção de 6,489 minutos, um pico cromatográfico com uma área de 37,7 e uma concentração de 434,9 mg/kg. Já na amostra fortificada, com a adição de 1 mL de solução stock de ácido propiónico observa-se um tempo

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

de retenção de 6,480 minutos, um pico cromatográfico com uma área de 121,8 e uma concentração de 1375,3 mg/kg.

Tabela 8.9 - Análise da exatidão para ambas as amostras.

| Amostras | C. amostra (mg/L) | C. amostra F (mg/L) | C. teórica (mg/L) | Recuperação (%) | |
|----------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|------|
| Pão de forma | 223,4 | 320,5 | 100 | 94,1 | |
| | 226,3 | 318,3 | | 92,1 | |
| | 227,0 | 318,2 | | 91,3 | |
| | 226,5 | 315,8 | | 89,3 | |
| | 223,5 | 314,5 | | 91,0 | |
| | 227,2 | 317,1 | | 89,9 | |
| | 229,6 | 313,1 | | 83,4 | |
| | 227,1 | 314,0 | | 86,9 | |
| | 224,2 | 319,6 | | 95,4 | |
| | 228,9 | 320,5 | | 91,6 | |
| | 222,6 | 315,4 | | 92,8 | |
| | 219,6 | 314,0 | | 94,4 | |
| | | | | Média | 91,0 |
| | | | | Desvio padrão | 3,2 |
| | | CV (%) | 3,5 | | |
| Bolo de arroz | 38,4 | 143,4 | 100 | 104 | |
| | 43,8 | 132,5 | | 88,6 | |
| | 45,0 | 128,5 | | 83,5 | |
| | 41,6 | 129,9 | | 88,3 | |
| | 42,2 | 142,3 | | 100 | |
| | 50,1 | 155,2 | | 105 | |
| | 43,4 | 138,8 | | 95,4 | |
| | 40,5 | 144,4 | | 104 | |
| | 42,4 | 150,6 | | 108 | |
| | 44,2 | 150,4 | | 106 | |
| | 40,1 | 147,7 | | 108 | |
| | 41,5 | 147,4 | | 106 | |
| | | | | Média | 99,7 |
| | | | | Desvio padrão | 8,6 |
| | | CV (%) | 8,6 | | |

Na Tabela 8.9 são apresentados os resultados da avaliação da exatidão, segundo os ensaios de recuperação para as amostras de pão e bolo.

De acordo com os resultados da Tabela 8.9 observa-se uma média de recuperação de 91,0% para a amostra de pão e de 99,7% para a amostra de bolo. Pode então concluir-se que o método utilizado é exato, uma vez que a faixa média aceitável para a avaliação da exatidão através de ensaios de recuperação de acordo com o critério da SGS é de 80% a 120% (Mesquita 2013).

8.5. Resultados das amostras recolhidas no mercado

De modo a uma melhor avaliação do método validado e atendendo a que o valor obtido de ácido propiónico na validação do método da amostra de panificação se encontrava a cima do valor de 2000 mg/kg em pão fatiado embalado, foram realizados estudos em amostras de produtos de padaria de diversas marcas (EFSA 2014). Nas figuras 8.9, 8.10 e 8.11 estão representados os cromatogramas para as amostras de pão A, B e C, respetivamente.

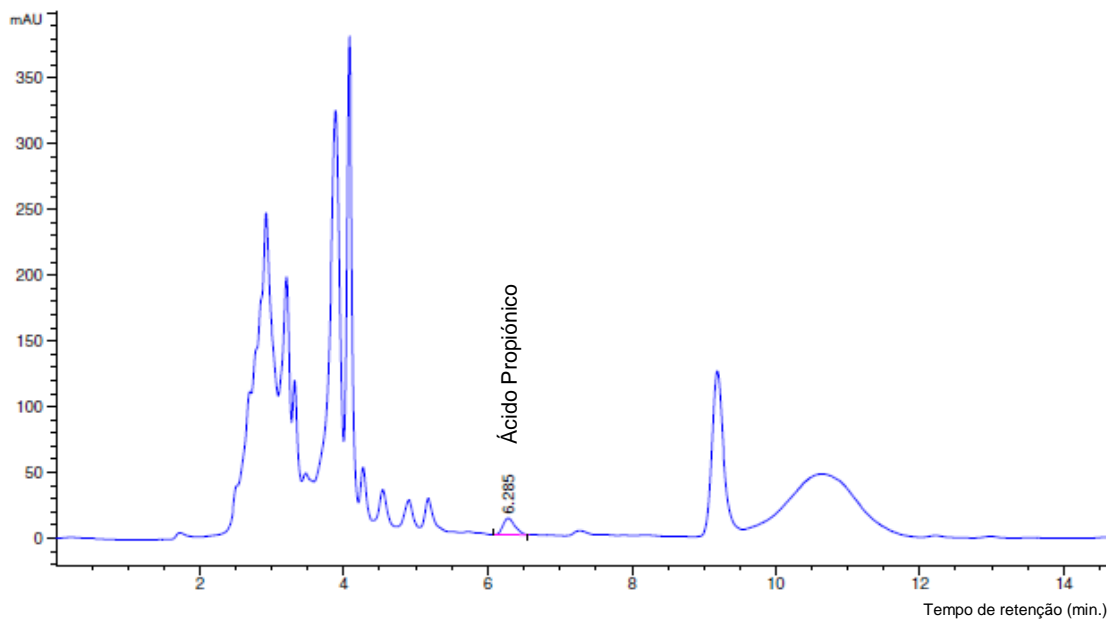


Figura 8.9 – Cromatograma referente à amostra A.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

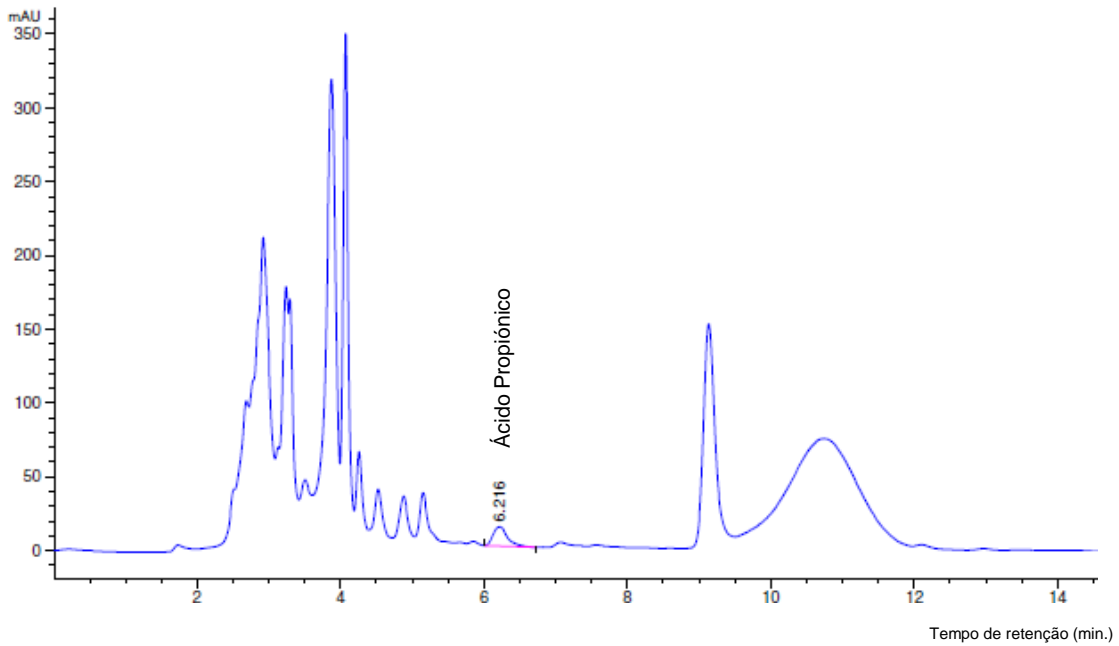


Figura 8.10 – Cromatograma referente à amostra B.

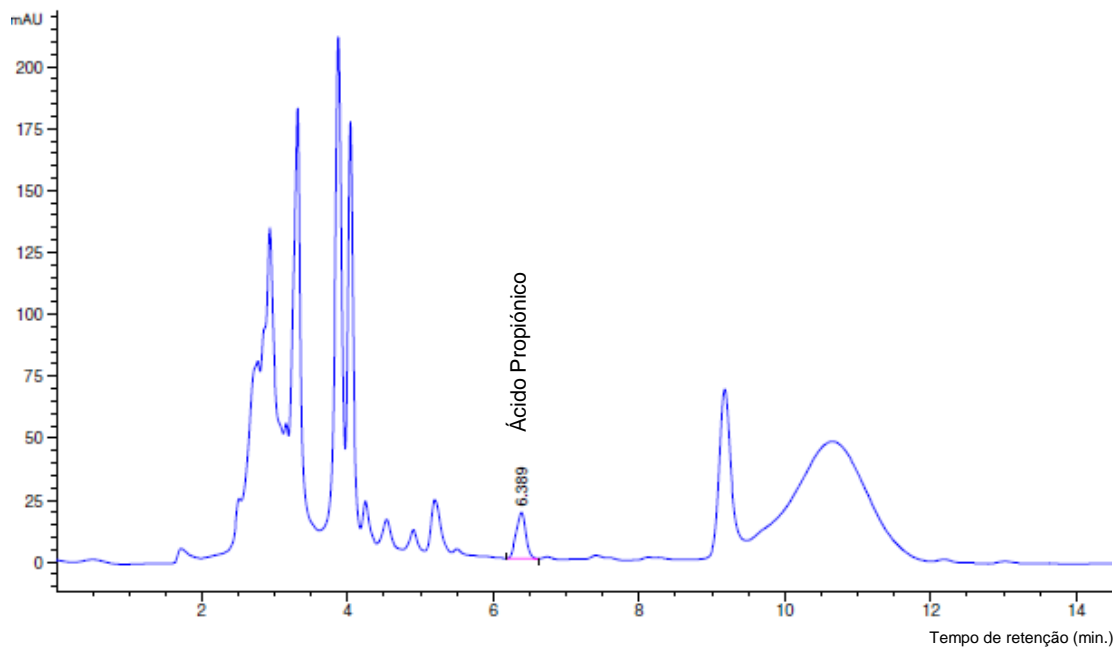


Figura 8.11 – Cromatograma referente à amostra C.

De acordo com os cromatogramas verificou-se a presença de ácido propiónico em todas as amostras analisadas, obtendo-se para a amostra A um tempo de retenção de 6,285 minutos, um pico cromatográfico com uma área de 148,3 e uma concentração de 1369,3 mg/kg. Já na amostra B, observa-se um tempo de retenção de 6,216 minutos, um pico cromatográfico com uma área de 182,5 e uma concentração de 1821,3 mg/kg. Por fim, para a amostra C observa-se um tempo de retenção de 6,389 minutos, um pico cromatográfico com uma área de 169,8 e uma concentração de 1760,3 mg/kg.

Para a realização deste ensaio foram feitas três extrações para cada uma das amostras. Na Tabela 8.10 são apresentados os resultados do estudo da média, desvio padrão e concentração para as amostras A, B e C.

Tabela 8.10 – Análise da concentração do analito em estudo das amostras recolhidas no mercado.

| Amostra | Desvio padrão | Concentração (mg/kg) |
|----------------|----------------------|-----------------------------|
| A | 37,5 | 1369,3 |
| B | 22,2 | 1821,3 |
| C | 10,9 | 1760,3 |

Analisando a Tabela 8.10 observa-se que a amostra A apresenta uma menor concentração de ácido propiónico (1369,3 mg/kg) relativamente à amostra B (1821,3 mg/kg) e à amostra C (1760,3 mg/kg).

Comparativamente com a amostra de pão utilizada para a validação do método proposto neste trabalho, pode observar-se que todas as amostras recolhidas no mercado apresentam uma concentração de ácido propiónico inferior à amostra analisada para a validação do método, que apresenta uma concentração média de 2246,5 mg/kg de ácido propiónico. É de notar que todas as amostras são de pão de trigo, contudo as amostras recolhidas no mercado são de pão de trigo integral, assim esta diferença de receita poderá estar relacionada com uma menor quantidade de analito usado e por conseguinte quantificado.

De acordo com a legislação, estas amostras encontram-se todas dentro dos limites estabelecidos por lei, onde os limites máximos são de 3000 mg/kg.

9. Conclusão

Este trabalho surgiu com o objetivo de implementar e validar o método de quantificação de ácido propiónico em produtos de padaria e pastelaria por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), uma vez que a SGS ainda não tinha uma metodologia para tal, tendo sido realizados estudos prévios à sua implementação e validação, de modo a chegar-se a um método simples e fiável para poder ser utilizado em análises de rotina num laboratório. O presente trabalho contribui, assim, para este objetivo.

Após o estabelecimento do método adequado procedeu-se à sua validação. Este processo, tem início nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos equipamentos, materiais e da mão-de-obra, continuando no decorrer da fase experimental. De modo a validar a metodologia foram realizados estudos de linearidade, limiares analíticos, repetibilidade, precisão intermédia e exatidão.

A linearidade foi verificada entre as concentrações de 25,0 mg/L e 400,0 mg/L, sendo que, qualquer valor fora desta gama caracteriza-se de extrapolação. De modo a evitar incertezas associadas a resultados que se apresentem fora da gama linear, deve-se proceder à diluição da amostra para concentrações superiores a 400,0 mg/kg, e caso a concentração seja inferior a 25,0 mg/kg deve pesar-se uma quantidade maior de amostra ou fortificá-la de modo à quantidade de analito se encontrar dentro do intervalo da gama de trabalho. O método possui um limite de deteção de 2,7 mg/L e um limite de quantificação de 8,2 mg/L.

Em termos de repetibilidade e precisão intermédia, para ambas as matrizes, a metodologia encontra-se validada uma vez que o coeficiente de variação foi inferior a 5%. Por último, foi também avaliada a exatidão do método recorrendo à realização de ensaios de recuperação para ambas as amostras em estudo. Aqui, obtiveram-se resultados positivos, uma vez que se apresentam dentro dos critérios de aceitação (80 – 120%), confirmando-se, assim, a validação do método.

Deste modo, conclui-se que após o cumprimento de todos os requisitos de cada etapa da validação, pode considerar-se o método como validado, podendo ser utilizado regularmente para a finalidade a que se destina, passando assim, a fazer parte da ampla gama de análises a produtos que a SGS Portugal se ocupa. A importância da validação centra-se no facto desta ser fundamental para determinar se os métodos desenvolvidos se adequam aos objetivos a que se destinam, a fim de se obterem resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente analisados.

Relativamente às amostras adquiridas numa grande superfície pode, também, concluir-se que os valores de ácido propiónico obtidos encontram-se dentro dos limites máximos estabelecidos na legislação.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

Finalizando, mostro a esperança de que este trabalho possa cumprir a sua missão, vindo a tornar-se um protocolo a ser utilizado pelos analistas na avaliação do controle de qualidade tanto nas matrizes aqui estudadas como aquando da avaliação de outras dentro do segmento estudado neste documento, de modo a garantir a viabilidade do método. Também terá um papel importante participar em ensaios interlaboratoriais ou utilizar materiais de referência certificados como outra forma de avaliar a exatidão.

Referências bibliográficas

- Al-Lahham, S.H.; Peppelenbosch, M.P.; Roelofsen, H.; Vonk, R.J.; Venema, K. (2010) Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(11), p.1175–1183. Doi: 10.1016/j.bbalip.2010.07.007.
- Al-Salem, H.S.; El-Ansary, A.; Asma, A.; Al-Dbass, A. (2016) Therapeutic potency of bee pollen against biochemical autistic features induced through acute and sub-acute neurotoxicity of orally administered propionic acid. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, p.1–10. Doi: 10.1186/s12906-016-1099-8.
- Alves, S.I.C. (2014) Validação de um método analítico para a identificação de ácidos gordos voláteis em águas intersticiais de sedimentos marinhos por spme-gc-ms. Tese de Mestrado em Química, Universidade de Lisboa, p.8-18.
- Al- Daihan, S.; Bhat, R. S. (2015) Impact of Propionic Acid on Liver Damage in Rats. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 4(3), p.189–195.
- Azzam, K.M.; Bahruddin, S.; Hashim, N.H; Rahim, A.A.; Talib, K.M. (2010) Determination of propionates and propionic acid in bakery products using gas chromatography. *International Food Research Journal*, 1112, p.1107–1112.
- Bernheim, S.; Deschênes, G.; Schiff, M.; Cussenot, I.; Neil, O. (2017) Antenatal nephromegaly and propionic acidemia: a case report. *BMC Nephrology*, 18, p.2–5. Doi: 10.1186/s12882-017-0535-4.
- Björk, C.; Wilhelm, U.; Mandrup, S.; Larsen, B.D.; Bordoni, A.; Hedén, P.; Rydén, M.; Arner, P.; Laurencikiene, J. (2016) Effects of selected bioactive food compounds on human white adipocyte function. *Nutrition & Metabolism*, 13, p.1–10. Doi: 10.1186/s12986-016-0064-3.
- Boyaval, P.; Corre, C. (1995) Production of propionic acid. *Laboratoire de recherches de technologie laitière*, 75, p.453-461.
- Brito, E. (2011) Conservantes. *Food Ingredients Brasil*, 18, p.29–31.
- Campos, G.; Nelson, D.L.; Ribeiro, C.; Mariem, R.; Heloisa, M.O.H.; Franklin; Gomides; Maria, F.; Naveira; Rita, M.P.; Tânia, M.A.G. (1997) Padronização de metodologia para determinação de ac.propionico em paes de forma. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 17(2), p.196–200.

- Castro, P.G. M (2014) Desenvolvimento de Processo Fermentativo para a Produção de Ácido Propiônico a Partir da Fração Hemicelulósica de Bagaço de Sorgo Sacarino [*Sorghum bicolor* (L .) Moench]. Tese de Mestrado em Tecnologia e Processos Químico e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p.8-13.
- Chust, R.B. (1990) Introdução Cromatografia de Líquidos. Boletim SPQ, 39, p.43–54.
- Codex Alimentarius (2016) General Standart for Food Additives. International Food Standarts, p.2-6.
- EFSA, 2011. Opinion on the safety and efficacy of propionic acid, sodium propionate, calcium propionate and ammonium propionate for all animals species. The EFSA Journal, 9(12), p.1–22.
- EFSA (2014) Scientific Opinion on the re-evaluation of propionic acid (E 280), sodium propionate (E 281), calcium propionate (E 282) and potassium propionate (E 283) as food additives. EFSA Journal, 12(7), p.3779.
- El-Ansary, A.; Al-Salem, H.S.; Asma, A.; Al-Dbass, A. (2017) Glutamate excitotoxicity induced by orally administered propionic acid , a short chain fatty acid can be ameliorated by bee pollen. Lipids in Health and Disease, 16(96), p.1–9. Doi: 10.1186/s12944-017-0485-7.
- Faraji, M.; Chiachi, S.; Dastmalchi, F. (2016) Determination of Propionates and Propionic Acid in Bread Samples Using High Performance Liquid Chromatography. The International Journal of Engineering and Science, 5(7), p.7–12.
- Fennema, O. R.; Parkin, K. L. e Damodoran, S. (2010) Química de Alimentos de Fennema. 4ªEd., Porto Alegre:Artmed, Santana, 900p. ISBN: 978-85-363-2248-3.
- Ferreira, A. (2010) Desenvolvimento farmacêutico e validação do método analítico de uma suspensão contendo paracetamol. Tese de Mestrado em Química, Universidade de Coimbra, p.26-41.
- Francisco, A. M. A. (2008) Desenvolvimento e Validação de uma Técnica Analítica para a Quantificação de Lamotrigina em Plasma Humano. Tese de Mestrado Integrado em Farmácia , Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, p.65-105.
- Gomes, P. (2012) SGS Portugal – 90 Anos. Revista de propriedade do Grupo SGS Portugal. Editora Lusoimpress, Lisboa p.39.
- Gomes, P. (2013) SGS Global. Revista do Grupo SGS Portugal, n. 33. Editora Fernandes & Terceiro S. A., p.66. ISSN 1647-7375.

- Guynot, M.E.; Marin, S.; Neira, P.; Bernadó, M.; Sanchis, V.; Ramos, A. J. (2002) Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 79, p.203–211. Doi: 10.1016/S0168-1605(02)00088-0.
- Himmi, E. H.; Bories, A.; Boussaid, A.; Hassani, L. (2000). Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, p. 435-440.
- Honorato, T.C.; Batista, E.; Pires, T. (2013) Aditivos alimentares : aplicações e toxicologia Food additives : applications and toxicology. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 8(5), p.1–11.
- Ibáñez, C. (2003) Analysis of total propionic acid in feed using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1017, p.161–166.
- ICH (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. p.9.
- Kuhn, J.R. (2009) Avancos na cromatografia líquida. Tese de Mestrado em Segurança de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas , p.42.
- Moares, J. E; Duarte, K. M. R.; Paulino, V. T. (2011) Cromatografia gasosa na determinação de ácidos graxos voláteis de materiais ensilados. *PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 5(29), p.14.
- Marquito, M.J.G. (2014) Influência dos aditivos de panificação na bioacessibilidade dos minerais do pão de trigo Influência dos aditivos de panificação na bioacessibilidade dos minerais do pão de trigo. Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Universidade Nova de Lisboa, p.11.
- Martins, A.F. S. (2016) Implementação e validação de métodos analíticos. Tese de Mestrado em Química, Universidade de Coimbra, p.7-20.
- Melo, M.R. (2007) Produção de ácido propiônico em soro de queijo por bactéria do rúmen bovino. Tese de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, p.3-12.
- Mesquita, L. (2013) Validation of a liquid chromatography methodology for the analysis of seven volatile fatty acids intermediates of anaerobic digestion. *Egenharia Sanitária Ambiental*, 18(4), p.295–302.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

- Ngome, M.T. (2013) Produção de ácido propiônico em soro lácteo por cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus*. Tese de Mestrado em Ciências do Alimentos, Universidade Federal de Lavras, p.29-50.
- Nollet, L. M. L. (2000) Food analysis by HPLC. 7ªEd., Marcel Dekker:New York, 1170p. ISBN: 0-8247-8460-X.
- Peres, T.B. (2002) Noções básicas de cromatografia. Em Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental-Instituto Biológico. 64(2), p. 227–229.
- Phechkrajang, C. M.; Yooyong, S. (2016) Fast and simple method for semiquantitative determination of calcium propionate in bread samples. Journal of Food and Drug Analysis, 25(2), p.254–259. Doi: 10.1016/j.jfda.2016.03.013.
- Porto, H.S.M. (2014) H PLC versus UPLC : avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos . Tese de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, p.4-19.
- Rabah, H.; Carmo, F. L. R. e Jan, G. (2017) Dairy Propionibacteria : Versatile Probiotics. Microorganisms, 5(24), p.1–17. Doi: 10.3390/microorganisms5020024.
- Regulamento CE) nº.1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008, L354, p.16-33.
- Regulamento (UE) nº.683/2016 da Comissão de 2 de Maio de 2016, Jornal Oficial da União Europeia, L117, p.28-29.
- RELACRE (2000) Guia RELACRE 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Relacre, Lisboa, p.60. ISBN: 972-8574-02-9.
- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.L.F.; Melo, L.F.C (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quimica Nova, 27(5), p.771–780.
- Scott, R.P.W. (2003) Principles and practice of Chromatography. In: Chrom-Ed Book Series. Kindle Edition, p. 106.
- SGS (2012) SGS em Portugal - 90 anos. Lusoimpress, p.39.
- SGS (2014) Leadership and innovation since 1878. Disponível em:
<http://www.sgs.com/~media/Global/Documents/Brochures/sgs-group-history-en.ashx>. Consultado no dia 19/2/2017.
- SGS (2016) Success Group profile 2016, p.8. Disponível em:
<http://www.sgs.com//media/global/documents/brochures/group-profiles/sgs-group-profile-en.pdf?la=en>. Consultado no dia 19/2/2017.

Implementação e validação do método de quantificação de ácido propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria

- Silva, P.D. (2012). Determinação de compostos fenólicos por HPLC. Tese de Mestrado em Química Industrial, Universidade da Beira Interior, p.17-31.
- Silva, S.I.C.V. (2010) Limonina em citrinos: análise, bioconversão e bioactividade. Tese de Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, p.33-44.
- Skoog; West; Holler; Nieman. (1998) "Principles of Instrumental analysis", Saunders Coll. Pub., 5ª.Ed., Orlando. p.1-16. ISBN: 0030020786.
- Sousa, L.M.C. (2012) Incorporação e optimização de aditivos alimentares e auxiliares. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar, Universidade Católica Portuguesa do Porto, p.1-9.
- Türkoglu, S. (2008) Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate ad potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. Food and Chemical Toxicology, 46, p. 2035-2041. Doi: 10.1016/j.fct.2008.01.043.
- US EPA (1991) R.E.D. Facts - Propionic acid. *In*: Pesticides and Toxis substances. United States Enviroment Protection Agency, p. 1- 4.
- Vasconcelos, M.A.S.; Filho, A.B.M. (2010) Técnico em Alimentos Conservação de Alimentos. Em Conservação de Alimentos, 1ª.Ed. UFRPE/CODAI, Pernambuco, p.130. ISBN: 978-85-7946-072-2
- Wang, Z.; Yang S. (2013) Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Bioresource Technology, 137, p.116–123. ISBN: 0960-8524. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.012.