



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2015

**António Pedro Fischer  
de Almeida Serôdio**

**Acrilamida em bolachas: ocorrência, análise e  
estratégias de mitigação**





**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2015

**António Pedro Fischer  
de Almeida Serôdio**

**Acrilamida em bolachas: ocorrência, análise e  
estratégias de mitigação**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo em bioquímica alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Pereira Passos, Investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento de Química e pelo Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**  
professor auxiliar com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

**Prof. Dr. Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes**  
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

orientador

**Prof. Dr. Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva**  
professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

O meu sincero agradecimento aos meus orientadores, Doutora Cláudia Passos e Professor Manuel António Coimbra por todo o apoio, dedicação, paciência, amizade, assim como todos os ensinamentos e conselhos transmitidos que me prestaram ao longo da minha tese.

Um agradecimento à Professora Sílvia Rocha e à Doutora Alisa Rudnitskaya pelo apoio fornecido neste trabalho.

À Rita, Magda, Guido e Cristina pela ajuda, apoio, disponibilidade e simpatia que sempre me transmitiram.

À Diana Costa pelo companheirismo e amizade ao longo deste trabalho. Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais e avós por me terem sempre apoiado.

Aos meus amigos, em especial à Vânia, Miguel, Frederico, Marta e Rita, obrigado pelo apoio e amizade.

Por fim, agradeço as condições de acolhimento da unidade de investigação QOPNA da Universidade de Aveiro.

**palavras-chave**

Acrilamida, bolachas, mitigação, extração, HS-SPME, RSM

**Resumo**

A acrilamida é um dos principais contaminantes alimentares em produtos confeccionados a altas temperaturas, como é o caso de bolachas. Esta substância é classificada como possível carcinogéneo, o que revela a importância da sua deteção, quantificação e mitigação. Neste trabalho foram aplicadas estratégias de mitigação recorrendo à adição de extratos naturais, como a pectina, o ácido tartárico e o ácido algínico. A pectina com 50% de metilesterificação em concentrações de 5% e a pectina desesterificada, em concentrações de 2% mostraram-se as mais eficazes na diminuição do teor de acrilamida em bolachas de sacarose e frutose, mantendo as suas propriedades organoléticas. Perante os atuais métodos de extração e quantificação de acrilamida em produtos alimentares, que requerem diversos tratamentos de extração e limpeza da amostra, neste trabalho é apresentado um método simples e de fácil aplicação baseado na extração por HS-SPME. As condições otimizadas de extração de 60°C, 10:30 de razão água:propanol (v:v) e 15 minutos de termostatização e 45 minutos de exposição à fibra foram definidas recorrendo a ferramentas de resposta de superfície com aplicação de um desenho experimental Box-Behnken. Em GC-MS, os limites de deteção (LoD) e quantificação (LoQ) deste método foram 611 µg/kg e 2037 µg/kg, respetivamente. Este método foi testado e validado em amostras reais de bolachas de aveia e de trigo. Pelo método de adição de padrão, a acrilamida foi quantificada na bolacha de aveia tendo-se obtido o valor de 2049 µg/kg. Na bolacha de trigo, o teor de acrilamida esteve abaixo do limite de deteção do método.

**Key-words**

Acrylamide, biscuits, mitigation, extraction, HS-SPME, RSM

**Abstract**

Acrylamide is a major food contaminant in products baked at high temperatures, such as biscuits. This substance is classified as a possible carcinogen, which reveals the importance of its detection, quantification and mitigation. In this work, mitigation strategies were applied by addition of natural extracts such as pectin, tartaric acid, and alginic acid. The pectin with 50% of methylesterification, in concentrations of 5%, and the pectin deesterified, in concentrations of 2% were shown to be most effective in lowering the level of acrylamide in sucrose and fructose biscuits, keeping their organoleptic properties. In view of the current methods of extraction and quantification of acrylamide in food, requiring several sample extraction and cleaning treatments, this work presents a method simple and easy to apply, based on the extraction by HS-SPME. The optimized extraction conditions were 60°C, 10:30 water:propanol (v:v) ratio, and 15 minutes of thermostatzation and 45 minutes of fibre exposure, determined using response surface tools with application of a Box-Behnken experimental design. GC-MS detection (LoD) and quantification (LoQ) limits of this method were 611 µg/kg and 2037 µg/kg, respectively. This method was tested and validated in commercial samples of oat and wheat biscuits. Using the standard addition method, a value of 2049 µg/kg was obtained for oat biscuits. For the wheat biscuits the value was below the acrylamide the detection limit.



## Índice Geral

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiv
Abreviaturas	xv
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Acrilamida</b>	<b>1</b>
1.1.1 Formação da acrilamida	1
1.1.1.1 Formação de acrilamida pela reação de Maillard	2
1.1.1.2 Outras vias de formação da acrilamida	3
1.1.2 Fatores que afetam a formação da acrilamida	5
1.1.3 Exposição à acrilamida	6
1.1.4 Toxicidade da acrilamida	8
1.1.5 Estratégias de mitigação da acrilamida em alimentos	9
<b>1.2 Métodos de análise e quantificação da acrilamida</b>	<b>12</b>
1.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)	18
1.2.1.1 Fibras de SPME	19
1.2.1.2 Processo de extração	20
1.2.1.3 Condições de HS-SPME	22
1.2.2 Cromatografia em fase gasosa com detetor por ionização de chama (GC-FID)	25
1.2.3 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com quadrupolo (GC-qMS)	26
<b>1.3 <i>Responce surface methodology</i> (RSM) e desenho experimental Box-Behnken</b>	<b>27</b>
<b>1.4 Método de adição de padrão</b>	<b>30</b>
<b>2. Objetivos do trabalho</b>	<b>33</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Materiais</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Mitigação de acrilamida em bolachas</b>	<b>38</b>
3.2.1 Preparação das amostras de bolacha	38
<b>3.3 Extração da acrilamida</b>	<b>40</b>
3.3.1 Extração sólido-liquido	40
3.3.2 Extração por HS-SPME	41
3.3.2.1 Otimização	41
<input type="checkbox"/> Seleção da fibra de SPME	41
<input type="checkbox"/> Otimização das condições da extração SPME	42
<input type="checkbox"/> Seleção da quantidade de bolacha	43
<input type="checkbox"/> Calibração externa e estudo da influência da variação do rácio água:propanol	44
3.3.2.2 Cálculo dos limites de deteção (LoD) e quantificação (LoQ)	44
3.3.2.3 Outras condições	44
<input type="checkbox"/> Influência do tempo de extração	44
3.3.2.4 Amostras reais	45
<input type="checkbox"/> Bolacha de Aveia e Bolacha de trigo “Maria”	45

□ Amostra de batata frita	46
<b>3.4 Metodologias de Detecção</b>	<b>47</b>
3.4.1 LC-MS	47
3.4.2 GC-FID	47
3.4.3 GC-qMS	48
<b>4. Resultados e discussão</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Estratégias de mitigação em bolachas</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Método de extração de acrilamida por HS-SPME-GC-FID</b>	<b>59</b>
4.2.1. Seleção da fibra de SPME	60
4.2.2 Otimização das condições HS-SPME por resposta de superfície (RSM)	61
4.2.3 Seleção da quantidade de bolacha a usar	67
<b>4.3 HS-SPME-GC-MS</b>	<b>68</b>
4.3.1 Calibração externa do método	68
4.3.2 Influência do rácio água:propanol na análise	70
4.3.3 Influência do tempo de extração	71
4.3.4 Amostra de bolacha de aveia	72
4.3.5 Batata frita	74
4.3.6 Bolacha de trigo “Maria”	75
<b>5. Conclusões e trabalho futuro</b>	<b>79</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	<b>81</b>
<b>7. Anexos</b>	<b>89</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura da acrilamida. ....	1
Figura 2 – Mecanismo de formação da acrilamida pela reação de Maillard (10). ....	3
Figura 3 – Vias de formação da acrilamida a partir de glucose, aminoácidos e ácidos gordos (15). ....	4
Figura 4 - Efeito da diminuição do pH e do aumento da temperatura na concentração de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Caso de batatas assadas no forno durante 25 min (19). ....	5
Figura 5 - Contribuição (%) do tipo de alimentos para a exposição da acrilamida na população: a) em geral; b) em crianças até aos 6 anos. Esquema retirado de Boon <i>et al</i> (29). ....	8
Figura 6 - Metabolismo da acrilamida proposto por D. S. Mottram <i>et al</i> (7) focado na formação da glicidamida dos complexos com DNA, hemoglobina (HGB) e glutathione (GSH). ....	9
Figura 7 - Constituição do suporte de SPME. Esquema adaptado de Kataoka <i>et al</i> (66). ...	18
Figura 8 - Absorção e adsorção e diferenças entre estas. Adaptado de Pawliszyn (70). ....	19
Figura 9 - Procedimento de extração DI-SPME e HS-SPME. Adaptado de Katoka e Saito (69). ....	21
Figura 10 – Exemplo do efeito da temperatura, tempo de equilíbrio na extração utilizando uma fibra PDMS 100 $\mu\text{m}$ e análise por GC-FID. Figura retirada de Pawliszyn (74). ....	23
Figura 11 - Esquema da injeção no GC. Adaptado de Kataoka <i>et al</i> (66). ....	24
Figura 12 - Esquema do cromatógrafo de gás com detetor por ionização de chama (GC-FID). ....	25
Figura 13 – Esquema de um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massa e os seus componentes. ....	26
Figura 14 -a) Esquema de cubo com as experiências segundo o desenho Box-Behnken e b) a combinação de três fatores de segunda ordem (22) e um ponto central (C). ....	29
Figura 15 - Método de adição de padrão. a) balões contendo analito; b) analito com adição de quantidades crescentes de padrão; c) balões com solvente até à marca. ....	31
Figura 16 - Representação gráfica da aplicação hipotética do método de adição de padrão. ....	31
Figura 17 – Embalagens das amostras de bolacha utilizadas: (A) Bolacha de aveia e (B) bolacha “Maria” ....	37

Figura 18 - Equipamento de ultrafiltração utilizado na extração dos polissacarídeos da salina da Universidade de Aveiro.....	40
Figura 19 - Esquema do procedimento de extração (HS-SPME) e análise (GC-qMS) das amostras de bolacha. ....	46
Figura 20 - Amostra de batata frita do fundo da fritadeira. ....	47
Figura 21 - Cromatógrafo de gás com detetor de ionização de chama (GC-FID).....	48
Figura 22 - Cromatógrafo de gás acoplado com espectrómetro de massa com quadropólo (GC-qMS).....	49
Figura 23 - Cromatograma obtido por GC-qMS com 500 µg/frasco de acrilamida (AA) e butiramida (BA) e respectivos tempos de retenção (min).....	49
Figura 24 - Representação gráfica do pH da massa das bolachas em função dos extratos adicionados.....	54
Figura 25 - Representação gráfica da concentração de acrilamida (µg/kg) em função dos extratos adicionados. ....	55
Figura 26 - Cor dos modelos de bolacha em comparação com os respetivos controlos: (1) extrato de café (0,1%), (2) extrato de café (0,5%) e (3) conjugação de extrato de café (0,15%) com ácido tartárico (0,1%). ....	55
Figura 27 - Valores de acrilamida encontrados nos controlos e respetiva adição de extratos no modelo de bolachas com frutose. *O ensaio com pectina (5%) em bolachas de sacarose foi efetuado em trabalhos anteriores.....	57
Figura 28 - Valores de pH da massa de bolachas com adição de extratos de café e respetivos modelos controlo.....	59
Figura 29 – Área dos picos de acrilamida em função dos diferentes tipos de fibra testados. Diferentes letras identificam diferenças significativas entre cada tipo de fibra testada. PDMS- polidimetilsiloxano; PA- poliácilato; CAR-PDMS – carboxeno-PDMS; PDMS-DVB – PDMS-divinilbenzeno; CW-DVB – carbowax-DVB.....	61
Figura 30 - Representação gráfica bidimensional (a) e tridimensional (b) do tempo de exposição e rácio água:propanol em função da área de acrilamida obtida a 40 (1), a 50 (2) e a 60 °C (3). ....	65
Figura 31 - Área dos picos de acrilamida em função da massa de bolacha inserida no frasco. ....	67
Figura 32 - Curva de calibração externa de acrilamida. ....	69
Figura 33 – Área cromatográfica da acrilamida em função de diferentes rácios de água:propanol, nomeadamente: 40:0 (roxo), 30:10 (verde), 20:20 (vermelho), 10:30 (azul escuro) e 0:40 (azul claro) (mL:mL). ....	70

Figura 34 - Variação da área cromatográfica do pico de acrilamida ao longo do tempo com adição de solução padrão de acrilamida (10,5 µg/frasco). .....	72
Figura 35 - Curva de calibração interna da amostra de bolacha de aveia, utilizando o método de adição de padrão. ....	73
Figura 36 – Fração do cromatograma (com extração de íão a $m/z$ 71) obtido com 1 g de bolacha de aveia, com o pico de acrilamida (AA) a eluir aos 14,97 min. ....	73
Figura 37 - Comparação das áreas de acrilamida obtidas com adição de 105 µg/frasco: a) 0, 1 e 4 g de batata frita; b) 0, 0,6 e 2,4 g de óleo vegetal (soluções modelo utilizando a quantidade de óleo (60%) existente na batata). ....	74
Figura 38 – Curva de calibração com bolacha de aveia (losangos) e bolacha de trigo “Maria” (quadrados). ....	76

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estabilidade da acrilamida em diferentes alimentos em função do tempo. Adaptado de Delatour e Périsset (23).....	6
Tabela 2 - Teor de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em diferentes tipos de alimentos segundo a EFSA, em 2009. Tabela adaptada de Capuano e Fogliano (3). .....	7
Tabela 3 - Métodos de análise de acrilamida em produtos alimentares, com indicação do tipo de alimento, tratamento e método utilizado. ....	15
Tabela 4 - Tipos de fibra e suas características, (72).....	20
Tabela 5 - Ingredientes e respetiva quantidade usada na formulação dos modelos de sacarose. ....	39
Tabela 6 - Extratos usados nos modelos de sacarose e frutose. ....	39
Tabela 7 - Fatores escolhidos para a optimização da extração por HS-SPME em três níveis. ....	42
Tabela 8 - Plano de experiências determinado pelo desenho experimental Box-Behnken. .	42
Tabela 9 - Plano de experiencias determinadas pelo desenho experimental Box-Behnken e as áreas obtidas de acrilamida para cada condição. ....	62
Tabela 10 - Coeficientes de regressão e $p$ -values para cada fator de resposta de superfície. ....	63
Tabela 11 – Informação nutricional da bolacha de aveia e da bolacha de trigo “Maria” fornecidas pelo produtor no rótulo do produto (Vieira de Castro – Produtos alimentares SA). ....	77
Tabela 12 - Resultados de $L^*ab$ da parte superior de bolachas.....	89
Tabela 13 - Resultados de $L^*ab$ da parte inferior de bolachas. ....	89

## Abreviaturas

AA –Acrilamida

BA –Butiramida

HMWaq – Extrato de café de alto peso molecular

TA – Ácido tartárico

LC –*Liquid chromatography*

RSM – *Responce surface methodology*

BBD - *Box-Behnken design*

GC – *Gas chromatography*

FID – *Flame ionization detector*

qMS – *quadropole mass spectrometry*

EFSA – *European Food Safety Agency*

GC-ToF-MS – *Gas chromatography time of flight mass spectrometry*

GC-ECD - *Gas chromatography electron capture detection*

GC-MS - *Gas chromatography mass spectrometry*

GC-MS-MS - *Gas chromatography tandem mass spectrometry*

HPLC-UV – *high performance liquid chromatography – ultraviolet detection*

HPLC-DAD - *high performance liquid chromatography – diod detection*

LC-MS – *liquid chromatography mass spectrometry*

LC-MS-MS – *liquid chromatography tandem mass spectrometry*

GCxGC-ToF-MS – *Comprehensive bidimensional gas chromatography*

DI-SPME – *Direct imersion solid-fase microextration*

HS-SPME – *Headspace solid-fase microextration*

LoD - *limit of detection*

LoQ - *limit of quantification*

MIM - *Multiple Ion Monitoring*





# **1. Introdução**

# 1. Introdução

## 1.1 Acrilamida

A acrilamida ou propenamida ( $C_3H_5NO$ ), é uma amida  $\alpha,\beta$ -insaturada (figura 1), muito solúvel em água (2 g/mL), incolor, e com um ponto de fusão de  $84,5^\circ C$  (1). Esta possui diversas aplicações, principalmente na forma de poliacrilamida (2). A importância desta molécula em várias reações deve-se ao facto desta possuir dois grupos funcionais, o grupo amida e uma dupla ligação vinílica disponível para um grande conjunto de reações (3). A acrilamida é usada em diversos campos da indústria química como é o caso do tratamento de águas e do fabrico de cosméticos, bem como reagente em diversos métodos de biologia molecular (4). No entanto, esta molécula tem vindo a chamar a atenção devido à sua toxicidade tanto para humanos como para animais.

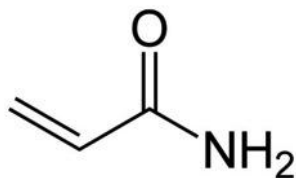


Figura 1 – Estrutura da acrilamida.

A presença de acrilamida em produtos alimentares foi anunciada pela primeira vez em 2002, pela *Swedish National Food Administration* e pela Universidade de Estocolmo, na Suécia. Esta foi detetada usando cromatografia líquida associada a um espectrómetro de massa (LC-MS), provando a existência de acrilamida em produtos alimentares tais como pão, bolachas, café e alimentos fritos (5). Ainda no mesmo ano, provou-se que a acrilamida não está presente em produtos crus e cozidos (6).

### 1.1.1 Formação da acrilamida

A acrilamida é formada em alimentos ricos em carboidratos quando processados a altas temperaturas ( $>120^\circ C$ ), atingindo concentrações da ordem dos  $\mu g/kg$  (6). Os açúcares,

como a glucose ou a frutose, e o aminoácido asparagina reagem numa reação conhecida como reação de Maillard (7). Esta reação entre grupos carbonilo de açúcares e grupos amina de aminoácidos é também responsável pela formação de diversos compostos com propriedades benéficas, as melanoidinas por exemplo, que são responsáveis pelo acastanhamento e sabor dos alimentos tostados, assados ou fritos (8).

#### **1.1.1.1 Formação de acrilamida pela reação de Maillard**

Pela via da reação de Maillard, a asparagina dá origem à acrilamida através de uma descarboxilação térmica seguida de uma desaminação que, por sua vez, necessita da presença de compostos com o grupo carbonilo disponível, como por exemplo, açúcares redutores (8). Teoricamente, apenas é necessário um grupo carbonilo para favorecer esta reação, mas tem sido demonstrado que compostos como a frutose e a glucose, que são compostos  $\alpha$ -hidroxicarbonílicos, são muito mais reativos e por isso mais eficientes na formação da acrilamida. Este facto deve-se à energia de ativação ser muito mais baixa (8). Foi também provado que os produtos decorrentes da decomposição dos açúcares na reação de Maillard, como por exemplo o glioxal, que é também um aldeído, contribuem para a formação da acrilamida (9). A reação de Maillard envolve inicialmente a reação do aminoácido asparagina (figura 2, composto 1) com um composto com o grupo carbonilo disponível (figura 2, composto 2). Deste primeiro passo resulta o respetivo conjugado N-glicosilo (figura 2, composto 3) e, após uma desidratação a alta temperatura, é formada uma base de Schiff, a N-glicosilasparagina (figura 2, composto 4) (10). Dá-se a descarboxilação da base de Schiff (figura 2, composto 5) e, a partir deste ponto, existem dois mecanismos possíveis. No primeiro forma-se diretamente a acrilamida (figura 2, composto 7) através de uma eliminação. No segundo, também da descarboxilação da base de Schiff, forma-se uma imina que, após sofrer uma hidrólise, forma a 3-aminopropanamida (figura 2, composto 6) e outros compostos carbonílicos. Por fim, a 3-aminopropanamida é desaminada termicamente dando origem à acrilamida (figura 2, composto 7) (7, 8, 10, 11).

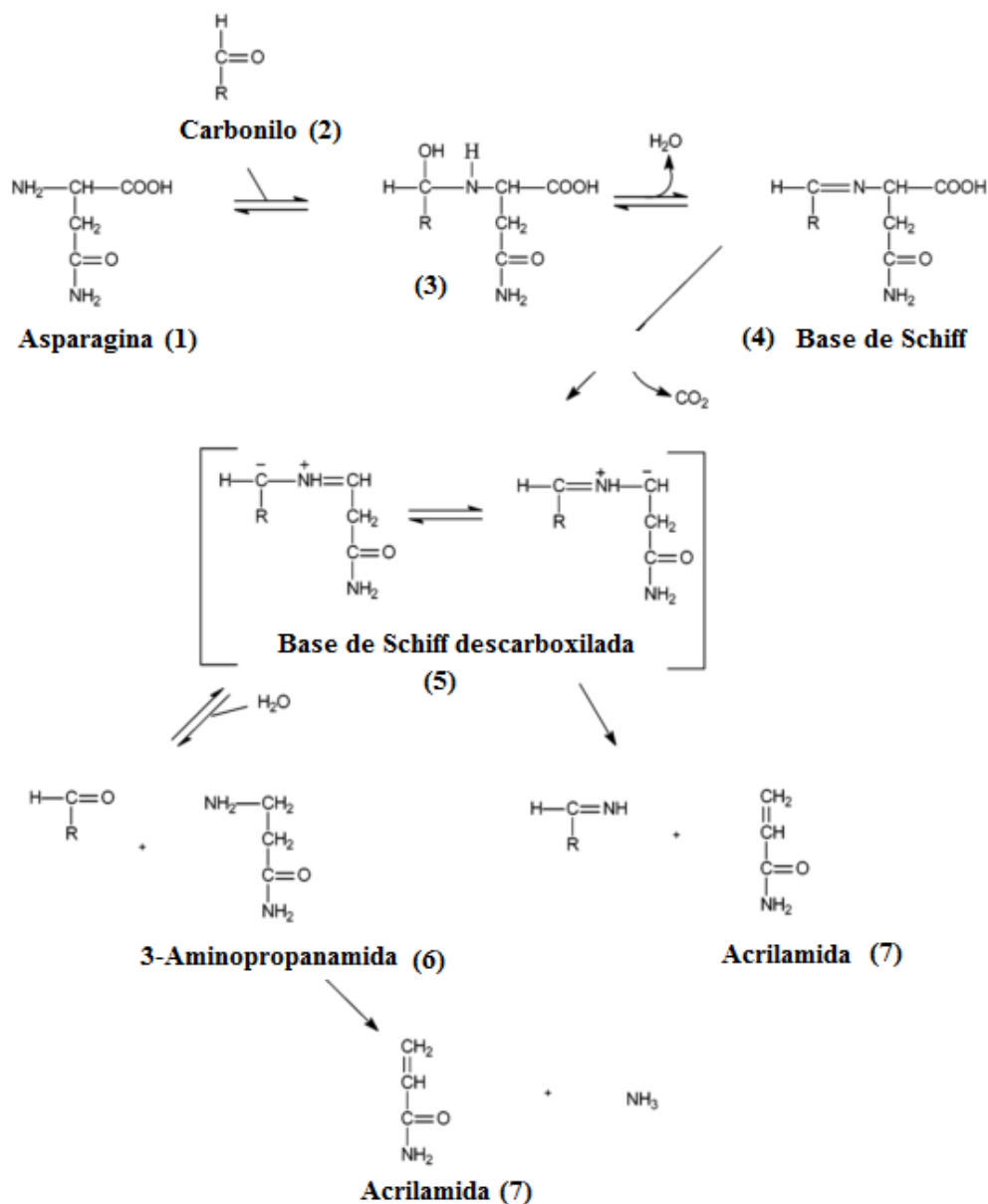


Figura 2 – Mecanismo de formação da acrilamida pela reação de Maillard (10).

### 1.1.1.2 Outras vias de formação da acrilamida

Embora a acrilamida seja formada em alimentos principalmente pela reação de Maillard, esta também pode ser formada por outras vias e ter outros precursores (8, 12–14). Os lípidos têm também um papel importante na formação da acrilamida, isto porque esta pode

também ser formada a partir dos triacilglicerídeos quando sujeitos a altas temperaturas, o que se torna importante em alimentos fritos (figura 3) (14,15).

Moléculas como o acetaldeído e o formaldeído, produzidas a partir de monoacilgliceróis a altas temperaturas, podem dar origem à acroleína, que por sua vez gera a acrilamida (figura 3) (16). Por outro lado, alguns aminoácidos decorrentes da degradação química de proteínas levam à formação do ácido acrílico a partir da sua cadeia carbonada (como a metionina) (17). Através de uma degradação de Strecker é fornecido o amoníaco necessário para o ácido acrílico passar a acrilamida (13). A descarboxilação de ácidos orgânicos (por exemplo o ácido málico, ácido láctico e ácido cítrico), assim como os ácidos gordos, também geram acroleína e por isso, acrilamida (18). Por fim, a glucose pode, através do metilglioxal, formar ácido acrílico (17). Estes processos são, no entanto, residuais quando comparados com a produção de acrilamida pela reação de Maillard (10).

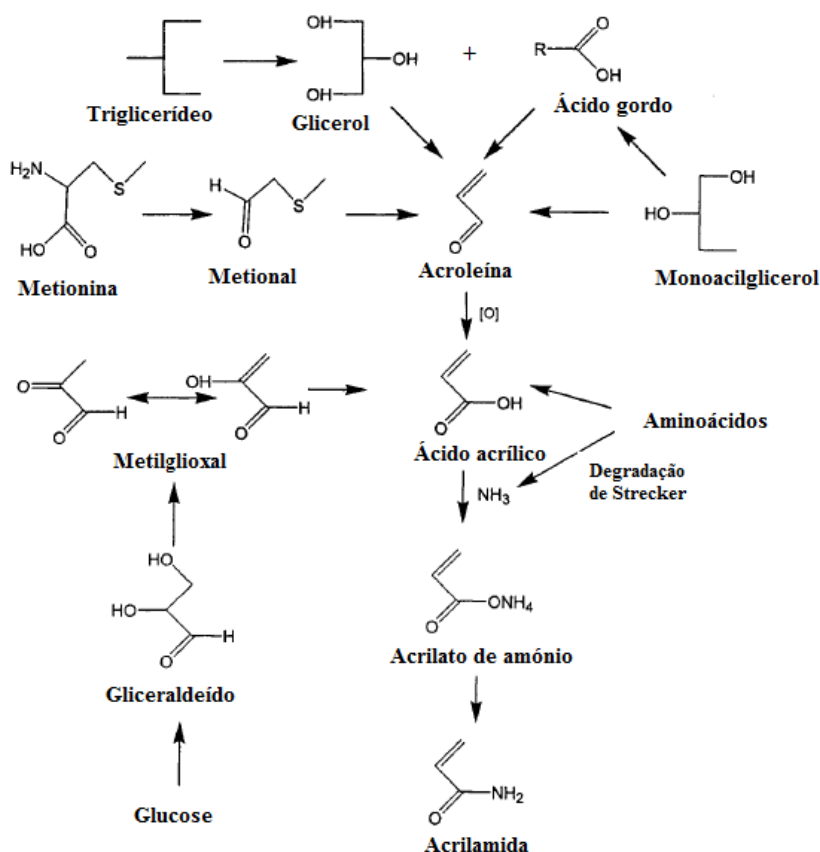


Figura 3 –Vias de formação da acrilamida a partir de glucose, aminoácidos e ácidos gordos (15).

### 1.1.2 Fatores que afetam a formação da acrilamida

Existem diversos fatores que podem influenciar a formação de acrilamida em alimentos. Os mais importantes são a temperatura, o tempo de exposição a altas temperaturas, a quantidade de água, o pH, assim como a concentração dos compostos que contribuem para a sua formação, tais como açúcares e aminoácidos (4, 19).

A quantidade de acrilamida produzida aumenta geralmente com a temperatura (figura 4), tendo, no caso de batatas fritas, o seu pico máximo a, aproximadamente, 190°C (7, 19). A quantidade de acrilamida formada é favorecida pelo aumento da percentagem de água em condições de pH ligeiramente alcalino, pH ao qual o grupo amina da asparagina se encontra mais reativo (19, 20). Portanto, à medida que o pH diminui, é também reduzida a quantidade de acrilamida formada (figura 4).

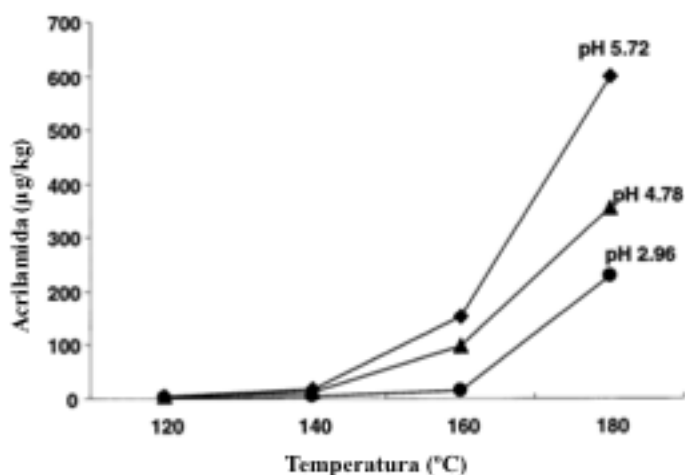


Figura 4 - Efeito da diminuição do pH e do aumento da temperatura na concentração de acrilamida (µg/kg). Caso de batatas assadas no forno durante 25 min (19).

Os parâmetros acima descritos são fatores externos ao alimento, mas existem outros fatores intrínsecos, nomeadamente os precursores da própria reação de Maillard existentes no alimento em causa. Esses precursores incluem aminoácidos, principalmente a asparagina mas também a metionina, e os monossacarídeos (glucose e frutose) e dissacarídeos (sacarose). Como precursores que são, a sua concentração influencia diretamente a quantidade de acrilamida que é formada (19, 20). A quantidade presente destes precursores

depende das receitas, bem como da origem dos ingredientes (local de produção, ambiente de crescimento das plantas, alimentação fornecida no caso de animais), do tempo e das condições de armazenamento das matérias-primas (22). Por outro lado, o próprio tempo de armazenamento de um produto pode ser determinante para a quantidade de acrilamida presente. A Tabela 1 ilustra o decréscimo no teor de acrilamida ao longo do tempo que é observado em vários produtos alimentares. Este facto pode ser explicado por possíveis reações da acrilamida com componentes dos alimentos que contribuem para o seu decréscimo e, nalguns casos, para a sua eliminação (23).

Tabela 1 - Estabilidade da acrilamida em diferentes alimentos em função do tempo. Adaptado de Delatour e Périsset (23).

Alimento	Intervalo de tempo (meses)	Concentração de acrilamida ( $\mu\text{g} / \text{kg}$ )	
		inicial	final
Chicória torrada	5	4015	3395
Café solúvel em pó	12	771	256
Cevada torrada	9	265	225
Cereais de pequeno-almoço	12	238	238
Chicória seca	5	214	174
Café torrado	7	203	147
Cacau	3	180	177

A atividade da água tem importância pois é fundamental para criar condições de mobilidade entre os precursores e assim possibilitar a reação de formação da acrilamida (3).

### 1.1.3 Exposição à acrilamida

A exposição humana à acrilamida está dependente de várias fontes. A acrilamida pode estar presente no ambiente, em cosméticos e fumo de tabaco (23, 24), mas é a sua presença em produtos alimentares que tem gerado mais preocupação no que diz respeito à saúde pública, principalmente por não haver até ao momento legislação que regule os seus limites. Segundo a agência europeia para a segurança alimentar (EFSA), cerca de 40% dos alimentos contêm acrilamida (24, 25). A quantidade de acrilamida consumida varia não só

com o tipo de alimentos como também com as porções ingeridas, que variam segundo as culturas e as regiões. Um alimento pode ter valores relativamente baixos de acrilamida e ser largamente consumido, tornando-se assim uma fonte importante de acrilamida numa determinada dieta. É de notar, por isso, que nos países ocidentais a maior parte da acrilamida consumida provém do pão, bolachas, batatas fritas e café, produtos largamente consumidos (Tabela 2) (2, 26). A quantidade de acrilamida neste produtos varia de marca para marca, pois depende da quantidade de precursores nos ingredientes utilizados e da maneira como são processados. Por outro lado, alimentos de origem animal, como a carne, têm normalmente valores de acrilamida bastante baixos, o que faz com que a exposição total à acrilamida seja mais baixa em dietas em que estes sejam muito consumidos (29).

Tabela 2 - Teor de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em diferentes tipos de alimentos segundo a EFSA, em 2009. Tabela adaptada de Capuano e Fogliano (3).

<b>Alimentos</b>	<b>Média (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>Máximo (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
<b>Bolachas</b>	317	4200
<b>Batatas fritas (embaladas)</b>	628	4180
<b>Batatas fritas</b>	350	2668
<b>Pão</b>	136	2430
<b>Café</b>	253	1158
<b>Cereais de pequeno-almoço</b>	156	1600

Um estudo feito na Holanda no ano de 2004 mostra que os alimentos que mais contribuem para a ingestão de acrilamida são os derivados da batata e os fritos (figura 5) (29). No entanto, é de notar que as bolachas aparecem como um dos alimentos que também mais contribui para a exposição à acrilamida, incidindo em 11% na população em geral (1 a 97 anos de idade (figura 5a)) e 17% em crianças (1 a 6 anos de idade (figura 5b)). Outra diferença entre os dois grupos que constituem a amostra deste estudo é a contribuição do café na população em geral (figura 5a), e no consumo de “snacks” pelas crianças (figura 5b).



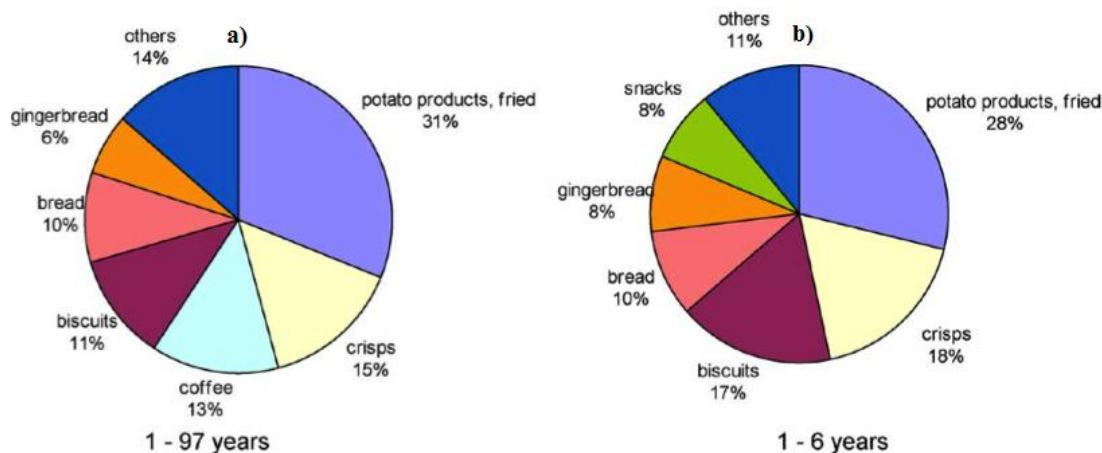


Figura 5 - Contribuição (%) do tipo de alimentos para a exposição da acrilamida na população: a) em geral; b) em crianças até aos 6 anos. Esquema retirado de Boon *et al* (29).

#### 1.1.4 Toxicidade da acrilamida

Nos últimos anos, a maioria dos trabalhos apresentados tem incidido no estudo da formação e deteção da acrilamida do que na avaliação dos riscos associados a esta (2). Apesar disso, muitos estudos têm vindo a ser desenvolvidos neste campo, provando que a acrilamida é tóxica e é um potencial carcinogéneo, com efeitos nos sistemas reprodutores e nervoso (2, 28). Sendo um composto polar e de baixo peso molecular, a acrilamida é rapidamente incorporada e distribuída pelo organismo. É classificada pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro como possível carcinogéneo, tendo sido demonstrada em ratos uma relação entre a exposição à acrilamida e o risco de contrair cancro em diversos órgãos (25, 29).

No fígado, a acrilamida pode ser epoxidada, formando a glicidamida (figura 6, passo 1). Este passo e a reação com a glutatona (figura 6, passo 2a e 2b) são das principais etapas do metabolismo da acrilamida e as que contribuem para os seus efeitos genotóxicos e carcinogénicos. A glicidamida (epóxido) é formada através de uma oxidação catalizada pelo CYP2E1 (citocromo P450) (figura 6, passo 1). Os epóxidos são compostos muito reativos conhecidos pela sua mutagenicidade, carcinogenicidade e pela sua interação com o DNA (32).

A formação de complexos com o DNA (figura 6, passo 3) é uma das causas que confere mutagenicidade a estes compostos. A ligação da acrilamida e glicidamida à hemoglobina vai formar aductos (figura 6, passo 4a e 4b, respetivamente) que, ao circularem na corrente sanguínea, facilitam a sua deteção e medição da exposição de um determinado indivíduo (2, 30).

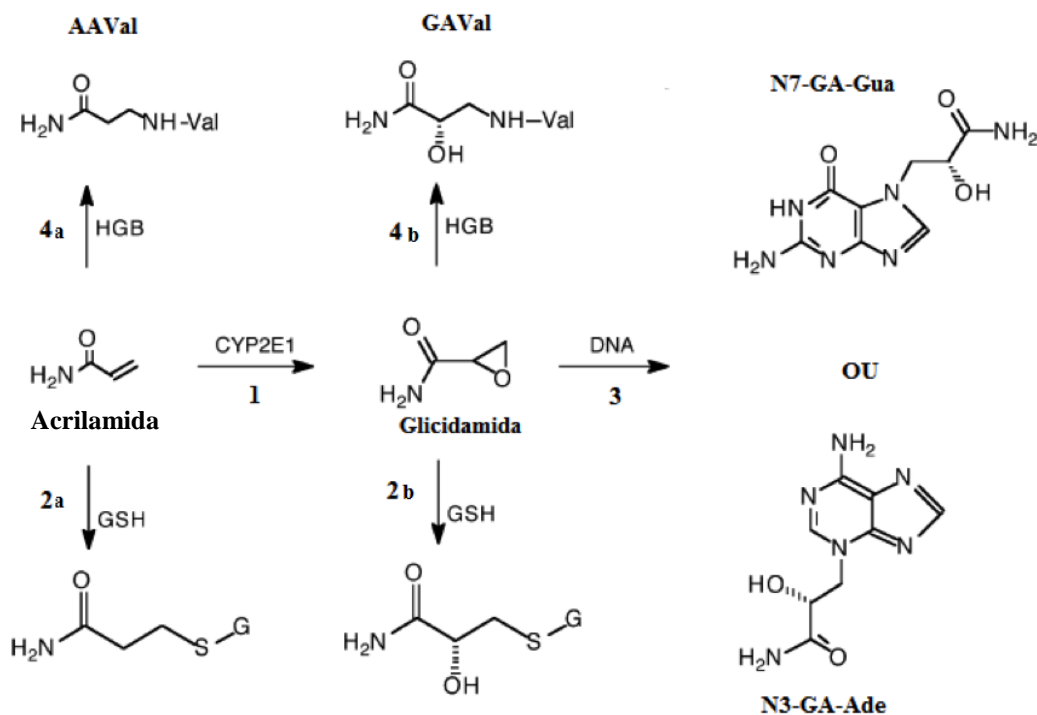


Figura 6 - Metabolismo da acrilamida proposto por D. S. Mottram *et al* (7) focado na formação da glicidamida dos complexos com DNA, hemoglobina (HGB) e glutatona (GSH).

### 1.1.5 Estratégias de mitigação da acrilamida em alimentos

A acrilamida é produzida na reação de Maillard juntamente com uma grande diversidade de compostos desejáveis que são responsáveis pela cor, aroma e textura dos alimentos (7). É, por esta razão, que os métodos de mitigação da acrilamida são estudos de alguma complexidade, uma vez que têm de ter em conta não só a formação da acrilamida mas também a manutenção de outros produtos responsáveis pelas propriedades sensoriais

dos alimentos. A maioria dos métodos de mitigação existentes incluem mudanças nas condições de processamento e/ou mudanças nas receitas/formulações do alimento (3).

Do ponto de vista da formulação dos alimentos, as possíveis estratégias de mitigação podem envolver: (1) uma seleção das matérias-primas tendo em conta a concentração de precursores da acrilamida na sua composição (por exemplo nas farinhas em produtos derivados dos cereais); (2) a adição de ingredientes ricos em proteínas ou aminoácidos livres, ácidos orgânicos ou antioxidantes naturais; (3) a substituição de açúcares redutores por outros não redutores (como baixar o teor de frutose substituindo-a por sacarose); (4) a substituição do bicarbonato de amónio (usado como agente de crescimento das massas) por bicarbonato de sódio em produtos como o pão e bolachas; (5) adição de enzimas como a asparaginase (3, 25, 31).

Existem também estudos que provam que há uma redução efetiva dos níveis de acrilamida através da modificação genética de algumas espécies no que diz respeito aos níveis de açúcares redutores. No entanto, estes estudos só incidiram até agora sobre produtos maioritariamente constituídos por amido (por exemplo a batata) e não tanto sobre derivados de cereais (33).

Como a maneira mais eficiente de reduzir o teor de acrilamida em alimentos é reduzir a quantidade dos seus principais precursores, nomeadamente asparagina e açúcares redutores, alguns métodos foram implementados diretamente nesse sentido. Além da substituição de parte de alguns açúcares redutores por outros não redutores, foi já estudada a influência da redução direta do outro precursor da acrilamida, a asparagina. Neste último, para diminuir eficazmente a asparagina (e por isso a acrilamida) usou-se a enzima L-asparagina amido-hidrolase ou (nome mais comum) asparaginase (34). Esta enzima tem a capacidade de hidrolisar a asparagina em ácido aspártico e amoníaco. Com este método, o teor de acrilamida diminuiu eficazmente em diversos alimentos, como produtos derivados da batata e de cereais sem modificar as suas propriedades sensoriais (3, 33). No entanto, o preço elevado da asparaginase é visto como um obstáculo ao seu uso em grande escala.

As condições de processamento dos produtos que mais influenciam a formação da acrilamida são a temperatura, o tempo de aquecimento, o pH e a atividade da água. A quantidade de acrilamida formada aumenta até uma determinada temperatura, como 170°C

(7), dependendo dos alimentos. Se a exposição for prolongada, os níveis de acrilamida começam a diminuir devido à sua degradação (7, 19, 34). No que diz respeito ao pH, sabendo que a acrilamida se forma maioritariamente a pH 8, a aplicação de níveis de pH mais baixos diminui a formação da acrilamida (19). Uma hipótese para esta diminuição deve-se à catálise ácida da acrilamida a ácido acrílico ou à protonação do grupo amina (R-NH<sub>2</sub>) da asparagina ao grupo R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, muito menos reativo (36). Existem diferentes estratégias que levam à diminuição do pH, como a adição de ácidos orgânicos, como é o exemplo do ácido tartárico. A redução do pH mostrou-se de facto efetiva na redução da acrilamida (19).

Mesmo havendo técnicas tão variadas para mitigar a acrilamida, é de notar que muitas destas estratégias estão ligadas também a uma possível formação de compostos indesejáveis. A substituição do bicarbonato de amónio pelo bicarbonato de sódio, leva a um aumento da ingestão de sódio, que é prejudicial para os consumidores com hipertensão (37). A adição de glicina leva a um acastanhamento excessivo e a diminuição da temperatura e/ou tempo de aquecimento dá origem a um acastanhamento insuficiente, afetando as propriedades visuais do produto (34). Por outro lado, na diminuição do pH nas receitas com sacarose é preciso ter em conta que esta, em ambiente ácido e a temperaturas elevadas, é hidrolisada em glucose e frutose, o que faz com que a acrilamida se forme em grande quantidade (20).

Sabendo que os indivíduos que sofrem de diabetes são incapazes de absorver eficazmente a glucose (38), vários alimentos foram modificados no sentido de não incluírem glucose na sua composição. Como substituinte da glucose tem sido usada a frutose, que é capaz de manter as propriedades sensoriais dos alimentos e é de fácil obtenção. No entanto, está provado que, por ser mais reativa, a reação da frutose com a asparagina é muito mais eficiente, resultando em valores muito mais elevados de acrilamida (19). Neste contexto, poderá ser necessária uma abordagem mais aprofundada no que diz respeito aos alimentos para diabéticos, pois estes poderão estar muito mais expostos à acrilamida do que os restantes consumidores.

## 1.2 Métodos de análise e quantificação da acrilamida

Desde a descoberta da acrilamida em alimentos, diversos métodos de análise têm sido utilizados para a determinação desta nos mais variados tipos de produtos. A maioria dos métodos utilizados é baseada em cromatografia de fase gasosa (GC) e em cromatografia de fase líquida (LC), podendo estes estar acoplados à espectrometria de massa (MS) para a detecção e identificação e dos compostos. De todos estes, o LC-MS é talvez o equipamento mais utilizado na detecção e quantificação da acrilamida.

Sendo os alimentos matrizes muito complexas, é necessário um tratamento da amostra previamente à injeção, tanto em GC como em LC. É neste tratamento onde ocorre a extração e limpeza da amostra, simultânea ou não. A maioria dos processos de extração usa água para dissolver as amostras devido à alta solubilidade da acrilamida neste solvente (6). No entanto, o solvente de extração pode ser também uma mistura de água com um solvente orgânico (39).

Os primeiros passos de extração podem ser conduzidos recorrendo a agitação forte, manual ou automática, assim como ao uso de vortex. Alguns métodos incluem neste processo o uso de banho de ultrassons para obter uma melhor extração da acrilamida da amostra e diferentes condições de centrifugação (velocidade e temperatura) (39). Têm sido também usadas extrações líquido-líquido que envolvem frequentemente uma posterior evaporação. Para calcular as taxas de recuperação, controlando assim as potenciais perdas de composto durante o processo de extração, é adicionado um padrão interno, sendo a [ $^{13}\text{C}_3$ ]-acrilamida, a [ $\text{D}_3$ ]-acrilamida e a [ $^{13}\text{C}_1$ ]-acrilamida os mais usados (39).

A purificação é um passo necessário que consiste em remover outros compostos que fazem parte da matriz complexa dos alimentos. Esta pode ser feita recorrendo a SPE (extração em fase sólida) e a purificação química. A SPE é um processo que, numa coluna, separa os analitos consoante a sua afinidade com a fase sólida (40). Alguns métodos aplicam várias repetições deste processo. A purificação química consiste na adição à amostra de agentes químicos que contribuem para a purificação da amostra, precipitando componentes indesejáveis. A adição das soluções de Carrez I e II ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e

ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, respetivamente) que contribuem para precipitação de vários componentes, tais como proteínas, é um exemplo deste tipo de limpeza da amostra (41).

No caso dos procedimentos para GC, a acrilamida é geralmente submetida a uma reação de derivatização. Esta é geralmente feita através de uma bromação da qual resulta na maioria dos estudos a 2,3-dibromopropanamida, podendo haver outros compostos bromados. Este procedimento foi proposto pela primeira vez usando bromato de potássio (KBr), ácido bromídrico (HBr) e bromo (Br<sub>2</sub>) (34, 40). A principal vantagem da utilização destes compostos bromados é o facto de, por serem mais voláteis, o seu desempenho cromatográfico e a seletividade do método de deteção serem melhorados (41). No entanto, este método é complexo e moroso (39).

Também para a separação e deteção existem vários processos propostos utilizados de acordo com o tipo de amostra a analisar, como seja o uso de GC-ToF-MS (42), GC-ECD (43, 44), GC-MS (6, 45– 49), GC-MS/MS (50, 51), HPLC-UV (52, 53), HPLC-DAD (54, 55), LC-MS (56–58) e LC-MS/MS (59–61). Todas estas técnicas têm como objetivo obter o menor limite de deteção (LoD) e por isso um menor limite de quantificação (LoQ), sendo o limite de deteção a concentração mínima distinguível do branco (três vezes o valor do branco) e o limite de quantificação a concentração mínima à qual o analito é quantificado com precisão adequada. Assim, o LoQ é sempre maior ou igual ao LoD (62).

Na Tabela 3 estão sumarizadas algumas das técnicas de separação e deteção e de pré-tratamento da amostra já usadas na análise da acrilamida. Nesta tabela é possível observar a influência dos diferentes tipos de extração, o uso de padrão interno, a derivatização da acrilamida e os métodos de separação e deteção com os respetivos limites de deteção e quantificação. Os diferentes tipos de detetores utilizados influenciam os limites de deteção. Os métodos baseados em cromatografia de gás que utilizam GC-MS/MS (50, 51) e GC-ECD (43, 44) apresentam menores limites de deteção comparados com os métodos de GC-MS (6, 45– 49) devido à menor sensibilidade deste. No caso de GC-MS, no que diz respeito à derivatização da acrilamida, observa-se que, nos estudos em que se recorre à utilização de acrilamida derivatizada obtêm-se menores limites de deteção. No caso de cromatografia líquida, os detetores influenciam também os limites de deteção e quantificação, como é o exemplo do LC-MS/MS (59–61) e HPLC-UV (52, 53) que

apresentam limites menores dos que são obtidos por LC-MS (56–58). O uso de padrão interno pode ter alguma influência, o que pode ser exemplificado nos estudos em que é utilizado HPLC-DAD (54, 55), com e sem padrão interno. O método que recorre à utilização de padrão interno tem um limite de detecção menor.

Tabela 3 - Métodos de análise de acrilamida em produtos alimentares, com indicação do tipo de alimento, tratamento e método utilizado.

<b>Amostra</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Padrão interno</b>	<b>Derivatização</b>	<b>Separação e detecção</b>	<b>LoD/LoQ</b>	<b>Ref.</b>
<b>Pão torrado, batatas fritas, cereais de pequeno-almoço</b>	Extração com n-propanol e MeCN	d <sub>3</sub> -acrilamida	-	GC-ToF/MS	LoQ: 15 e 40 µg/kg	(42)
<b>Batatas fritas, fritos</b>	Extração com n-hexano e derivatização com KBrO <sub>3</sub> e KBr, extração líquido-líquido com acetato de etilo.	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	Bromação	GC-ECD	LoD: 0,1 µg/kg	(43)
<b>Bolachas e batatas fritas</b>	Extração com ciclohexano e acetato de etilo	<sup>13</sup> C-acrilamida	Bromação	GC-MS	-	(45)
<b>Batatas fritas e carne cozida</b>	Extração com água, filtração purificação em coluna e derivatização	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	Bromação	GC-MS	LoD: 5 µg/kg	(6)
<b>Batatas fritas</b>	DI-SPME em matrizes aquosas	acrilamida	-	GC-MS/MS	LoD: 0,1 µg/L	(50)
<b>Pão frito, massa vaporizada</b>	Amostras tratadas com eter de petróleo para a remoção de gorduras. Extração com solução de cloreto de sódio.	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	Bromação	GC-MECD	LoD: 0,10-0,15 µg/kg	(63)
<b>Batatas fritas</b>	Extração com metanol, purificação com soluções de Carrez I e II e centrifugação	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	-	GC-MS	LoD: 15 µg/kg	(46)
<b>Massas fritas e não-fritas, bolachas e batatas fritas.</b>	Extração com água, remoção de gorduras com n-hexano e depois da derivatização extração líquido-líquido com acetato de etilo.	-	Bromação	GC-ECD	LoD: 0,60 µg/kg	(44)



<b>Batatas fritas</b>	MSPD seguida de limpeza com n-hexano e eluição com água	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	-	GC-MS	LoD: 5-50 µg/kg	(47)
<b>Cereais, bolachas, carne e batatas fritas</b>	Remoção de gorduras com iso-hexano. Extração com água, purificação com soluções de Carrez I e I, centrifugação e filtração.	D <sub>3</sub> -acrilamida	-	GC-MS/MS	LoQ: 5 µg/kg	(51)
<b>Produtos derivados de cereais</b>	Extração com água, acidificação e purificação com soluções de Carrez I e II. Derivatização e limpeza em coluna de cromatografia	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	Bromação	GC-MS	LoD: 2 µg/kg	(48)
<b>Cereais de pequeno-almoço</b>	Extração com acetonitrilo, centrifugação e derivatização. Extração com HS-SPME.	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	Sililação	GC-MS	LoD: 0,9 ppb	(49)
<b>Batatas fritas</b>	Extração com água, centrifugação. Extração com DI-SPME.	-	-	GC-MS/MS	LoD: 0,1 µg/L	(50)
<b>Produtos fritos derivados de massas fermentadas</b>	Extração com água e centrifugação a 0°C	acrilamida	-	HPLC-UV	LoD: 6 µg/kg	(52)
<b>Bolachas, café, batatas e cacau</b>	Extração com água, centrifugação, filtração e lavagem com hexano	acrilamida	-	HPLC-UV	LoD: 10 µg/kg	(53)
<b>Produtos derivados da batata</b>	Extração com metanol e purificação com soluções de Carrez I e II, evaporação e SPE.	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	-	HPLC- DAD	LoQ: 4 µg/kg	(54)
<b>Bolachas, batatas fritas, carne</b>	Adição de soluções de Carrez I e II e de ácido acético, centrifugação e filtração.	-	-	LC-MS	LoD: 0,5 µg/L	(56)
<b>Batatas fritas, bolachas</b>	Extração com solução de 75% metanol em água seguida de SPE.	-	-	HPLC-DAD	LoD: 30 µg/kg	(55)
<b>Batatas fritas</b>	Extração com água, purificação com soluções de Carrez I e II e SPE com metanol.	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	-	LC-MS	LoD:23,2 µg/kg	(57)

<b>Cereais para crianças, bolachas, tostas</b>	Extração com solução aquosa de NaCl. Extração líquido-líquido com acetato de etilo e limpeza por SPE	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -acrilamida	-	LC-MS-MS	LoQ: 1 µg/kg	(59)
<b>Pão</b>	Extração com água seguida de centrifugação e limpeza por SPE	D <sub>3</sub> -acrilamida	-	LC-MS-MS	LoD: 13 µg/kg	(60)
<b>Batatas fritas, cereais de pequeno-almoço, bolachas e pão</b>	Extração com metanol, purificação com soluções de Carrez I e II e limpeza por SPE	-	-	LC-MS	LoD: 2 µg/kg	(58)
<b>Bolachas, batatas fritas, fruta seca, chocolates e café</b>	Extração aquosa, centrifugação e limpeza por duas colunas de SPE conjugadas	D <sub>3</sub> -acrilamida	-	LC-MS-MS	LoD: 45 µg/kg	(61)

GC-ToF/MS – Cromatografia de gás acoplada com espectrometria de massa de tempo de voo; GC-ECD – GC acoplada com detetor de captura de eletrão; GC- MECD - GC com microdetetor de captura de eletrão; HPLC-UV - Cromatografia líquida de alta performance com deteção ultravioleta; HPLC-DAD – HPLC com detetor de díodos; DI-SPME – microextração em fase sólida através de imersão direta; HS-SPME – SPME no espaço de cabeça.

### 1.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração proposta no início da década de 1990 por Janusz Pawliszyn, inicialmente para a análise de compostos poluentes em água (64). Quando comparada com as restantes técnicas, esta é de relativa simplicidade, rápida, sensível e seletiva, e permite a recolha de um determinado analito de uma fase líquida ou gasosa (65). A extração é feita recorrendo a um suporte parecido com uma seringa que contém uma fibra no seu interior (figura 7). A fibra (fase sólida) é revestida por diferentes tipos de polímeros e é escolhida de acordo com a natureza do composto a extrair.

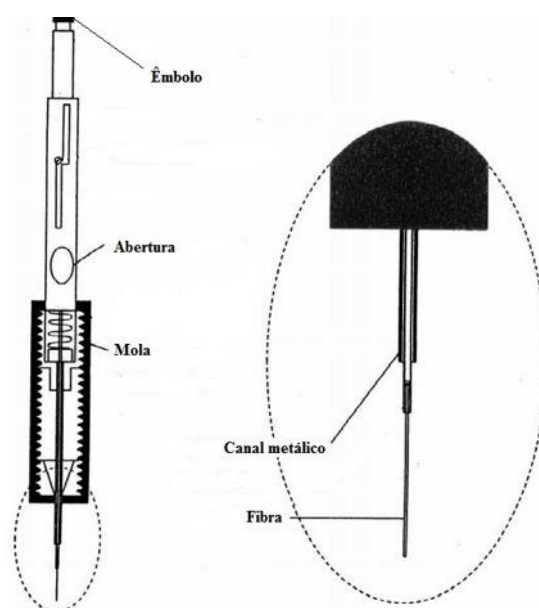


Figura 7 - Constituição do suporte de SPME. Esquema adaptado de Kataoka *et al* (66).

Existem vários tipos de polímeros utilizados para este efeito e estes, dependendo da sua constituição, vão adsorver e/ou absorver as moléculas do analito, concentrando-o na sua estrutura polimérica (67– 69).

### 1.2.1.1 Fibras de SPME

A fibra de SPME comercialmente disponível e mais utilizada é revestida por polidimetilsiloxano (PDMS), um material apolar que tem uma maior afinidade para compostos apolares. Pelo contrário, a fibra de poliacrilato (PA) é uma fibra mais polar e, portanto, mais indicada para compostos polares. Tanto a PDMS como a PA possuem uma estrutura linear e, por isso, menor área superficial. De maneira a aumentar a eficiência de extração, outros tipos de fibras foram desenvolvidos misturando os revestimentos anteriores com outros revestimentos como o polidivinilbenzeno (DVB) e o carboxeno (CAR). PDMS-DVB, carbowax (CW)-DVB, PDMS-CAR e DVB/CAR/PDMS são exemplos destas composições com partículas sólidas porosas e, por isso, com grandes áreas superficiais. Estas são usadas para recolher compostos de baixo peso molecular e polares (Tabela 4) (69). Nestes tipos de fibra, o revestimento pode estar ligado, não-ligado, ligado por ligações parcialmente cruzadas ou por ligações cruzadas ao suporte. Estas características são importantes para a sua estabilidade tendo em conta o solvente em que estas vão estar em contacto (66). Devido às características de cada fibra, estas podem reter os analitos por absorção ou adsorção (figura 8).

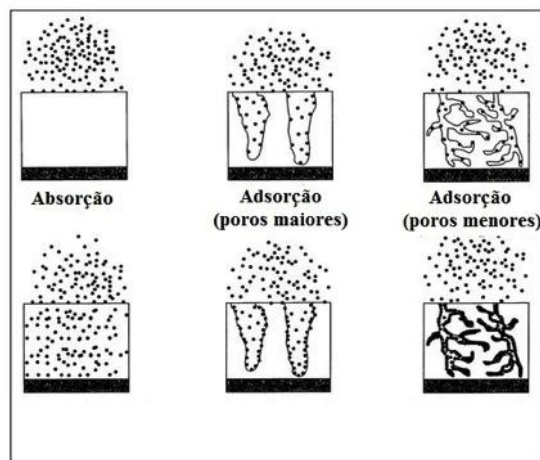


Figura 8 - Absorção e adsorção e diferenças entre estas. Adaptado de Pawliszyn (70).

No processo de absorção, os compostos extraídos entram e saem da fibra e a sua retenção depende da espessura do revestimento, pois quanto maior a espessura, maior é a retenção do analito. Neste tipo de revestimentos, praticamente não há competição entre os

compostos a extrair. No processo de adsorção, a extração é feita devido à interação física com os analitos. A grande área superficial porosa contribui para um aprisionamento dos compostos no interior dos poros. As fibras de adsorção possuem uma capacidade limitada de extração devido ao número limitado de lugares de ligação. A utilização deste tipo de fibras pode afetar a ligação de compostos com menor constante de distribuição, isto é, com menor capacidade de ligar à fase sólida (71). As fibras são comercializadas com diferentes cores consoante tipo de revestimento, sendo assim mais facilmente identificáveis (Tabela 4).

Tabela 4 - Tipos de fibra e suas características, (72)

<b>Fase estacionária</b>	<b>Espessura do revestimento(<math>\mu</math> m)</b>	<b>Polaridade</b>	<b>Método de extração</b>	<b>Cor</b>
<b>PDMS</b>	100, 30, 7	Apolar	Absorção	Vermelha, amarela, verde
<b>PA</b>	85	Polar	Absorção	Branca
<b>CAR-PDMS</b>	75, 85	Mista	Adsorção	Preta, azul clara
<b>PDMS-DVB</b>	65	Mista	Adsorção	Azul escura
<b>CW-DVB*</b>	65	Polar	Adsorção	Laranja
<b>DVB/CAR-PDMS</b>	50/30	Mista	Adsorção	Cinzenta

PDMS- polidimetilsiloxano; PA- poliacrilato; CAR-PDMS – carboxeno-PDMS; PDMS-DVB – PDMS-divinilbenzeno; CW-DVB – carbowax-DVB

\* A fibra CW-DVB já não é comercializável.

### 1.2.1.2 Processo de extração

O processo de extração começa com a inserção da amostra a analisar num recipiente que, no caso de compostos voláteis, é selado, e que no topo tem um septo onde o suporte de SPME possa ser inserido. Antes da extração, é necessário realizar uma limpeza da fibra de forma a evitar a contaminação associada a utilizações anteriores. O suporte é inserido no recipiente e só depois é que a fibra é exposta (figura 9). A fibra pode ser exposta à fase de vapor, no espaço de cabeça (*headspace*, HS) (figura 9 – A), ou imersa diretamente na amostra (*direct immersion*, DI) (figura 9 - B), dependendo do tipo de análise. Ao contrário do DI-SPME, em que os analitos são recolhidos diretamente pela imersão da fibra na amostra, no tipo HS-SPME os analitos são recolhidos da fase gasosa que tende para o equilíbrio com a amostra, evitando-se assim a contaminação por moléculas não-voláteis que possam existir na matriz. Por outro lado, o HS-SPME permite que a constituição da amostra não afete a fibra.

Quando a fibra está no espaço de cabeça, os analitos são adsorvidos e/ou absorvidos da fase gasosa tendo já sido extraídos da matriz à medida que o sistema tende para o equilíbrio (70).

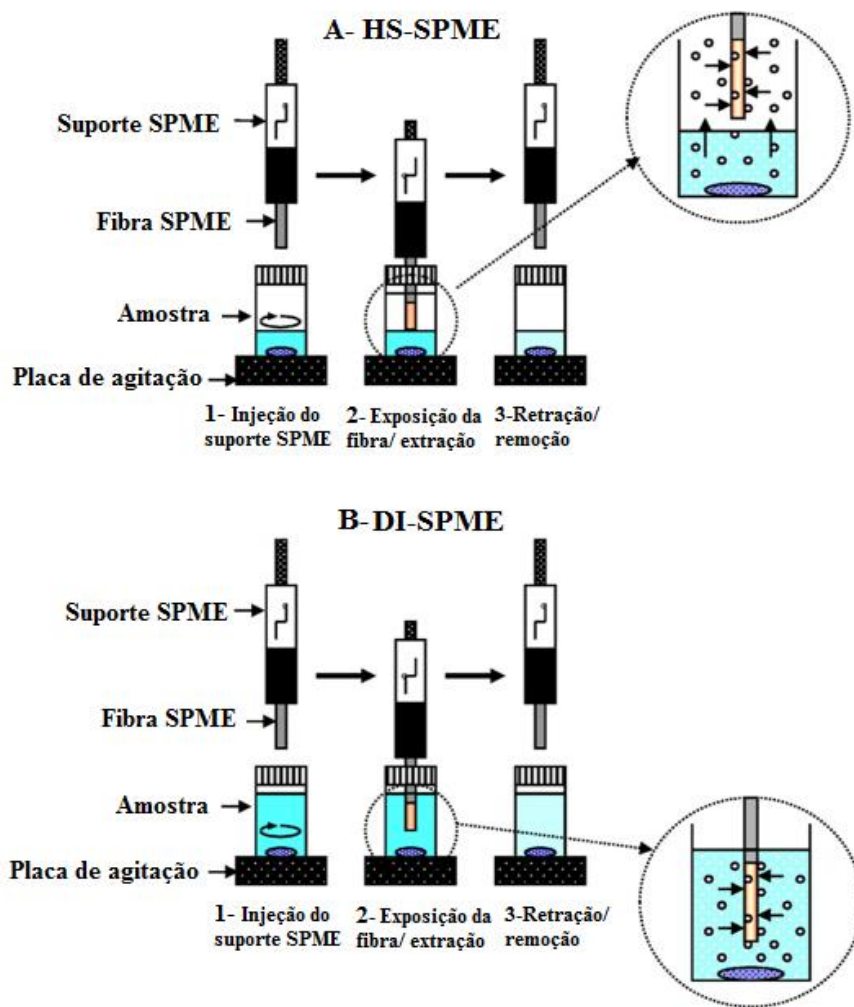


Figura 9 - Procedimento de extração DI-SPME e HS-SPME. Adaptado de Katoka e Saito (69).

Neste trabalho iremos incidir no tipo HS-SPME, com microextração em fase sólida no espaço de cabeça (70).

### 1.2.1.3 Condições de HS-SPME

Quando a fibra é exposta à fase gasosa, o sistema tende para o equilíbrio entre a fase sólida da fibra e a fase gasosa. Antes deste, já existe necessariamente uma tendência para o equilíbrio entre a fase de vapor e a matriz da amostra. O equilíbrio entre as diferentes fases pode não chegar a concretizar-se, sendo portanto, de grande importância que o tempo de extração seja bem controlado. A velocidade de extração varia de composto para composto e com a capacidade da amostra passar para a fase gasosa (constante de distribuição). Portanto, os compostos voláteis e não polares (com maior constante de distribuição) são extraídos muito mais rapidamente que os semivoláteis e voláteis polares (com menor constante de distribuição) (70).

O processo de extração pelo método HS-SPME depende de diversas condições que podem ser variadas de acordo com o composto a extrair e de maneira a otimizar todo o sistema. Algumas das condições mais estudadas incluem a temperatura, o teor de sal, o pH, a agitação, a quantidade de solvente orgânico o tempo de extração, a matriz da amostra e o tipo de fibra (69, 71, 74).

A temperatura influencia o equilíbrio entre as diferentes fases, pelo que afeta igualmente a extração. No HS-SPME a amostra é normalmente aquecida acima dos 30°C por uma questão de controlo, pois os testes à temperatura ambiente estão sujeitos a grandes variações. O coeficiente de partição entre a fibra e a fase gasosa diminui com a temperatura, o que faz com que menor quantidade de composto seja sorvido. No entanto, esta redução na sorção é compensada pelo aumento do coeficiente de partição entre a amostra e a fase gasosa, o que provoca um aumento da concentração de analito na fase gasosa, e consequentemente, uma maior sorção. O equilíbrio entre as diferentes fases varia de analito para analito, sendo este atingido mais rapidamente por compostos com maior volatilidade (70). Na figura 10 está representada, como exemplo, a relação entre a temperatura e o tempo de extração de metanfetamina até atingir o equilíbrio. Verifica-se que, a temperaturas mais elevadas, o equilíbrio é alcançado mais rapidamente, sendo que a temperaturas mais baixas o processo é mais moroso, o que pode não ser desejável em algumas aplicações. Neste último caso, a extração pode ser conduzida antes do equilíbrio ser atingido, o que poderá levar a grandes

variações nos resultados e afetar a reprodutibilidade do método de extração. Estas variações podem ser minimizadas aplicando condições de agitação e de tempo de extração bem controladas. As extrações que demorem mais tempo a atingir o equilíbrio (normalmente a baixas temperaturas), como o exemplo da curva a 22°C na figura 10, terão menores variações, mas serão obtidas menores concentrações de analito. A temperatura é também um fator importante quando os compostos a extrair são termicamente lábeis, pois temperaturas mais baixas permitem manter a sua estabilidade e consequente velocidade e sensibilidade do método (74).

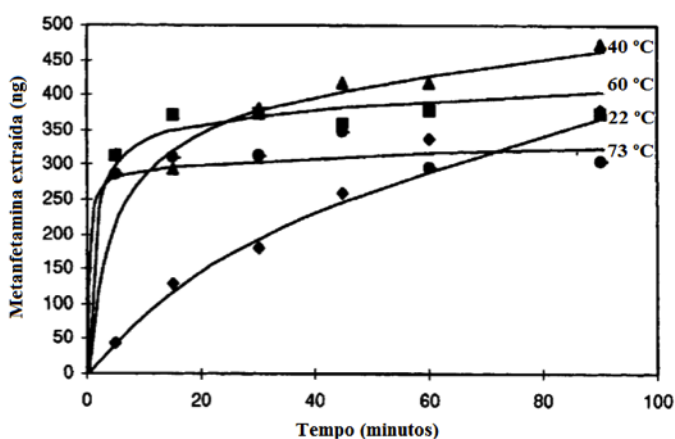


Figura 10 – Exemplo do efeito da temperatura, tempo de equilíbrio na extração utilizando uma fibra PDMS 100 µm e análise por GC-FID. Figura retirada de Pawlisyn (74).

A agitação é, na maioria das vezes, feita através de um mecanismo de agitação magnética e vai também contribuir para a transferência dos compostos da amostra para o espaço de cabeça, que por sua vez passam para a fibra. Esta tem maior importância em compostos com menor volatilidade e necessita de ser constante durante todo o tempo de extração (67, 74, 75).

Vários sais solúveis (como o NaCl) têm sido utilizados para promover o efeito de *salting-out* devido à saturação da amostra e assim aumentar a eficiência do processo de extração (66). Por outro lado, à medida que a concentração de sais aumenta, a extração pode diminuir pois há a possibilidade destes interagirem com os analitos. A interação eletrostática



ou covalente, no caso de sais orgânicos, ou iônica pode levar à diminuição da quantidade de composto extraído (74).

O pH tem uma importância maior quando este pode influenciar a forma dos analitos de interesse e a sua afinidade com a fibra, afetando assim a sua extração. É importante notar que para acidificar ou alcalinizar o meio, devem ser adicionados ácidos e bases não-voláteis para que não haja interferência com o composto desejado. É também de extrema importância que o volume de amostra se mantenha constante durante toda a análise (66).

Depois de recolhido o analito na fibra, esta é sujeita ao processo de dessorção, processo no qual o analito é recolhido para análise. A técnica de HS-SPME pode ser usada em conjunto com a cromatografia de gás (GC), GC-MS, HPLC ou LC-MS. No caso do HPLC, os analitos são dessorvidos numa câmara de dessorção por aspiração ou pela passagem de um solvente e transferidos para a coluna de LC (66). O processo de dessorção dá-se com o aquecimento da fibra no injetor e o principal objetivo é a remoção total do analito da fibra de maneira a que não haja variações. Por esta razão, a temperatura e o tempo de dessorção têm de ser controlados tendo em conta a tolerância de cada fibra e a quantidade de analito dessorvido. Depois de libertados, os analitos são transferidos diretamente para a coluna de cromatografia onde serão analisados (figura 11) (66).

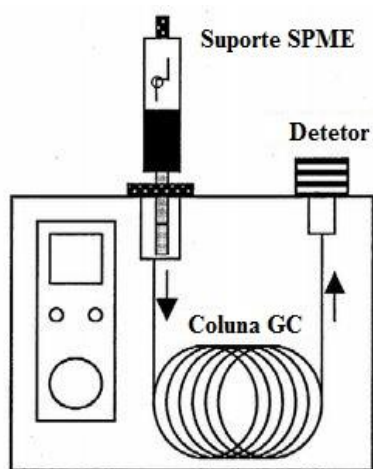


Figura 11 - Esquema da injeção no GC. Adaptado de Kataoka *et al* (66).

## 1.2.2 Cromatografia em fase gasosa com detetor por ionização de chama (GC-FID)

A cromatografia em fase gasosa (GC) baseia-se no arrastamento dos compostos juntamente com uma fase móvel gasosa através de outra fase não miscível com a anterior (fase estacionária). Na cromatografia em fase gasosa, a fase móvel é um gás de arraste, podendo ser este hélio, azoto ou hidrogénio. O gás desloca-se através da coluna a velocidades diferentes arrastando os compostos, que consoante a solubilidade são separados. Os compostos são introduzidos na coluna através de um injetor no qual a temperatura e o fluxo de gás (controlado por reguladores de pressão) promovem a entrada dos compostos na coluna. A injeção pode ser feita recorrendo a uma seringa ou a uma fibra de SPME. Depois de serem arrastados ao longo da coluna, os compostos são transportados para o detetor (figura 12). A amostra é injetada em modo *splitless*, em que na primeira a totalidade da amostra é introduzida na coluna. A coluna encontra-se no interior de um forno e é neste que, com diferentes rampas de temperatura e com ajuda do gás de arraste, os compostos no interior da coluna são separados. Os compostos com ponto de ebulição menor (mais voláteis) ou com baixa afinidade com a fase estacionária são eluídos em primeiro lugar.

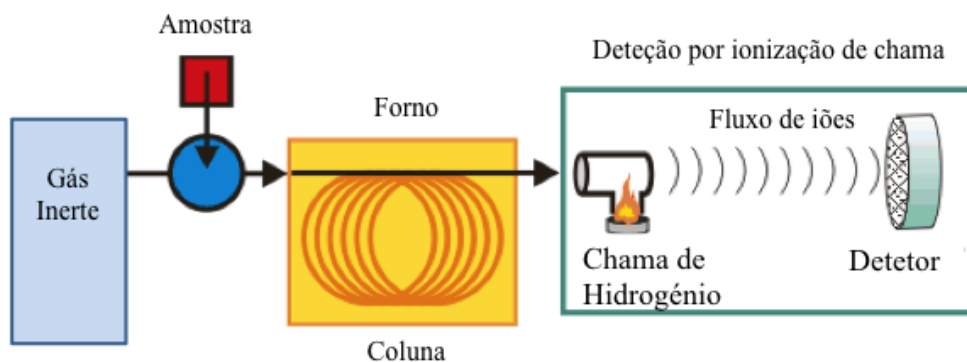


Figura 12 - Esquema do cromatografo de gás com detetor por ionização de chama (GC-FID).

Depois da separação dos compostos na coluna, o detetor de ionização por chama (*flame ionization detector* - FID) é usado para determinar cada um deles. À chegada da chama, os compostos eluídos são misturados com hidrogénio e ar e dá-se uma combustão (figura 12). Os compostos são ionizados na chama e a estes iões é aplicada um potencial elétrico. Acima da chama, um coletor de eletrões vai medir a corrente produzida. Por fim, de acordo com o sinal recolhido, é obtido um cromatograma (75) e pelo seu tempo de retenção é possível identificar determinado composto e quantificá-lo pela área cromatográfica do seu pico.

### 1.2.3 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com quadrupolo (GC-qMS)

A técnica de GC-qMS aparece como meio de separação e deteção de vários compostos extraídos por HS-SPME, nomeadamente compostos voláteis (76). Tal como em GC-FID, o processo cromatográfico ocorre baseando-se no arrastamento dos compostos juntamente com uma fase móvel (que neste caso é o hélio) através da fase estacionária. Este arrastamento dá-se numa coluna de revestimento específico e a diferentes temperaturas. No fim da coluna os compostos são transferidos para o espectrómetro de massa.

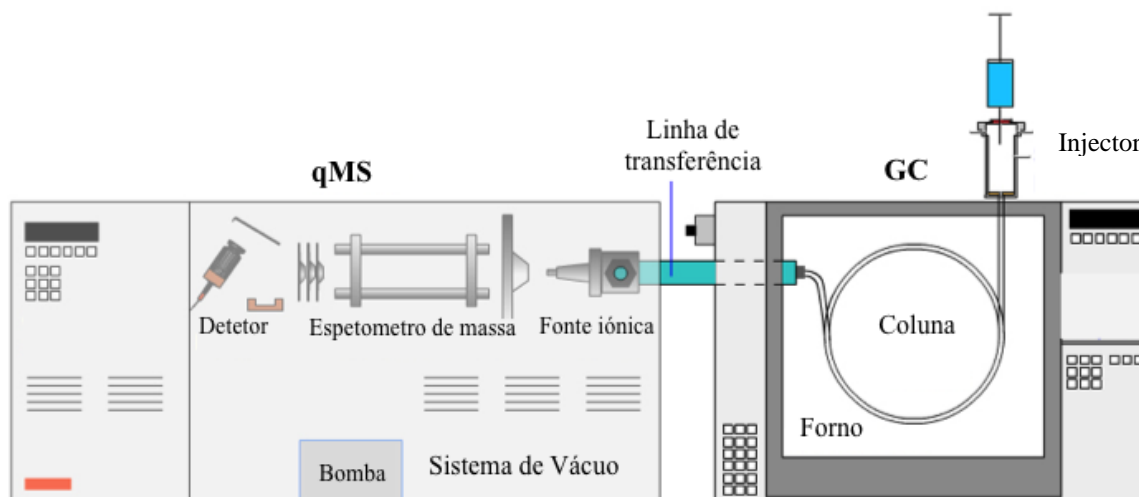


Figura 13 – Esquema de um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massa e os seus componentes.

O sistema de GC-qMS (figura 13) é constituído, como o nome indica, por um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massa. O cromatógrafo de gás é constituído por um injetor, uma coluna revestida por uma fase estacionária, uma fase móvel de gás e um detetor (75). No espectrómetro de massa do tipo quadropolo (qMS), dá-se a ionização das moléculas que chegam da coluna. Este processo de ionização dá-se sob vácuo e dá origem a fragmentos moleculares (iões com diferentes razões massa/carga). Os fragmentos obtidos resultam do tipo de ionização por impacto electrónico e são depois separados por diferentes campos eléctricos do quadropolo em direcção ao detetor (75). Cada composto é caracterizado por um tipo de fragmentação específica, apresentando por isso um espectro de massa específico, espectro esse que depende da energia dos electrões ionizantes e da temperatura do detetor. Os espectros de massa obtidos são constituídos pela abundância (eixo das ordenadas) em função da razão massa/carga ( $m/z$ ) no eixo das abcissas.

Tal como em GC-FID, nos cromatogramas é possível identificar determinado composto pelo seu tempo de retenção e informação quantitativa pela área cromatográfica dos seus picos (75). Uma das vantagens do GC-MS encontra-se no facto de cada ponto do cromatograma estar associado a um espectro de massa, permitindo a identificação dos picos dos cromatogramas recorrendo à comparação dos seus espectros de massa com espectros de padrões (76).

### **1.3 *Response surface methodology* (RSM) e desenho experimental Box-Behnken**

Nos últimos 10 anos diversos métodos estatísticos têm sido utilizados como ferramenta de otimização de métodos de análise (77, 78). Estes são escolhidos tendo em consideração o número de experiências necessárias, a menor quantidade de reagentes usada e o menor tempo de trabalho laboratorial. O termo otimização refere-se, em química analítica, como meio de descobrir as condições às quais um determinado método obtém a melhor resposta possível (79). Tradicionalmente, os processos de otimização são conduzidos de maneira a determinar a influência de cada fator, isto é, quando um é variado, os restantes são mantidos constantes. Este tipo de otimização, para além do elevado número de experiências que leva a mais tempo de trabalho laboratorial e a um maior gasto de materiais, não tem em

consideração o efeito das interações entre as variáveis. Com o objetivo de ultrapassar este problema, a otimização de métodos analíticos tem sido conduzida recorrendo a técnicas de análise estatística multivariada nas quais a metodologia de resposta de superfície aparece como uma das mais utilizadas.

A *Response surface methodology* (RSM) ou metodologia de resposta de superfície é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que tem como base a aplicação de uma equação polinomial aos dados experimentais recolhidos com o objetivo de prever estatisticamente o comportamento do método (80). Esta pode ser aplicada quando a resposta do método for influenciada por uma série de variáveis.

Antes de aplicar a RSM é primeiro necessário escolher um modelo de desenho experimental, o qual irá determinar quais as experiências necessárias a realizar e as suas combinações. Desenhos experimentais para modelos de primeira ordem (desenhos fatoriais) podem ser usados quando os dados não apresentam curvatura. Por outro lado, para adaptar uma função a um conjunto de dados que não pode ser descrito por funções lineares, devem ser usados desenhos experimentais para superfícies quadráticas tais como: o desenho fatorial de três níveis, desenho de Box-Behnken (BBD), desenho de compósito central (CCD) e os desenhos Doehlert (DM) (81). Para a aplicação de um modelo de desenho experimental, é feita uma seleção de variáveis independentes com maior impacto no método a otimizar e são também delimitadas as condições do domínio experimental. Depois de escolhido o desenho experimental e feitos os ensaios experimentais definidos pelo mesmo, os dados obtidos são tratados estatisticamente. É verificada se é necessária e possível uma deslocação na direção da região ótima. Por fim, são obtidos os valores ótimos para cada variável. O desenho experimental Box-Behnken é baseado em fatoriais de três níveis ( $3^k$ ) incompletos, ou em fatoriais de segunda ordem rotativos. Quando usados três fatores, este tipo de desenho pode ser representado de duas formas: um cubo com pontos a meio de cada aresta e um ponto central (figura 14, a), ou uma figura com a combinação de três fatoriais de segunda ordem ( $2^2$ ) e um ponto central (figura 14, b).

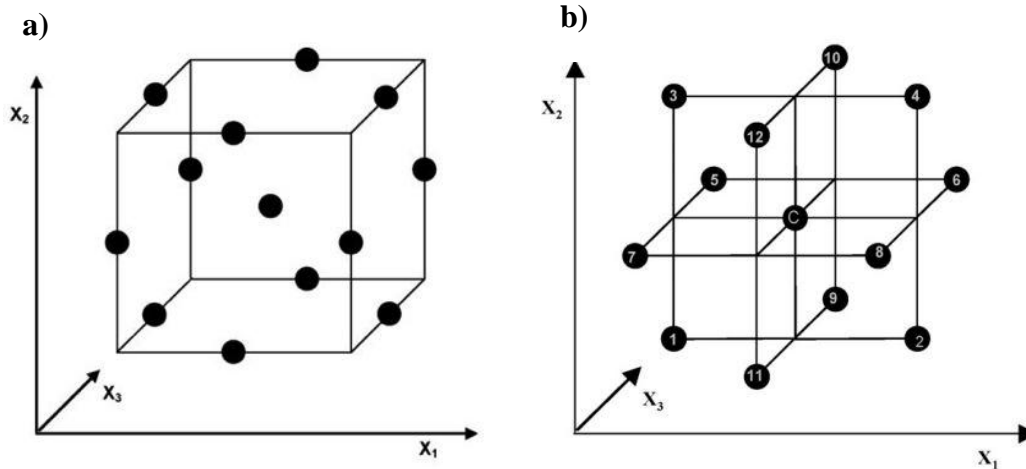


Figura 14 -a) Esquema de cubo com as experiências segundo o desenho Box-Behnken e b) a combinação de três fatoriais de segunda ordem (2<sup>2</sup>) e um ponto central (C).

Quando usado o desenho experimental Box-Behnken para três fatores, são necessárias apenas 13 experiências enquanto num fatorial completo, em que todas as combinações deveriam ser testadas, seriam necessárias 27, e no caso de serem efectuadas, por exemplo, 3 réplicas para cada experiência, seriam necessárias 81 experiências. A diferença entre o uso do desenho experimental Box-Behnken e do uso de um fatorial completo é substancial, tanto em tempo de trabalho como em uso de reagentes.

Uma outra vantagem do desenho experimental Box-Behnken é que este não contém combinações para as quais as variáveis tomam, simultaneamente, o seu valor máximo ou mínimo (nos vértices do cubo – figura 14 a). Este tipo de desenho experimental é, por isso, útil quando as condições máximas ou mínimas podem originar resultados indesejáveis. Por fim, por este não ser um fatorial completo, evita que seja necessário um número elevado de experiências, sendo possível prever o comportamento da resposta para os três fatores em simultâneo.

## 1.4 Método de adição de padrão

No método de adição de padrão, quantidades conhecidas de analito são adicionadas a uma amostra com quantidade de analito desconhecida. Este método é apropriado quando não se conhece ao certo a composição da amostra ou esta é complexa (como é o caso de amostras alimentares)(82). A matriz é tudo aquilo que faz parte da amostra e que não é o analito, e é definido por efeito da matriz as alterações no sinal analítico causado por tudo o que na amostra não seja o analito. Nalgumas amostras, os elementos da matriz podem reagir ou reter o analito, por isso a composição da matriz afeta o sinal analítico do composto de interesse, não sendo por esta razão adequada uma curva de calibração externa. No método de adição de padrão, que é a mesma substância que o analito, pressupõe-se que a matriz tem a mesmas interações com o padrão que tem com o analito (82).

Uma maneira de exemplificar este método pode ser descrita como: para vários balões volumétricos é adicionada a mesma quantidade de amostra (fila (a), figura 15). A um dos balões não é adicionado padrão (balão 1 figura 15) depois, quantidades crescentes de padrão são adicionadas (balões 2-5, fila b), figura 15). Por fim, de maneira a terem todos o mesmo volume, os balões são cheios com o solvente indicado (fila c), figura 15). De seguida, o conteúdo de todos os balões é analisado e os valores são arranjados numa representação gráfica (figura 16). A interseção da linha de tendência com o eixo das ordenadas é o valor obtido para o frasco que contém só a amostra diluída e a interseção da linha de tendência com o eixo das abcisas é o valor da concentração do analito que terá de ser depois multiplicado pelo respetivo fator de diluição (82).

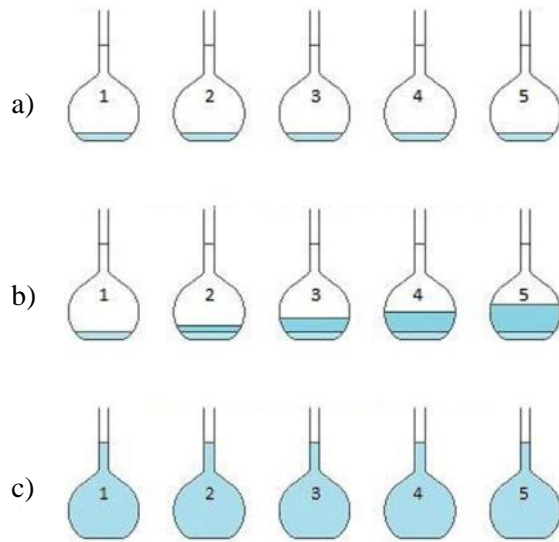


Figura 15 - Método de adição de padrão. a) balões contendo analito; b) analito com adição de quantidades crescentes de padrão; c) balões com solvente até à marca.

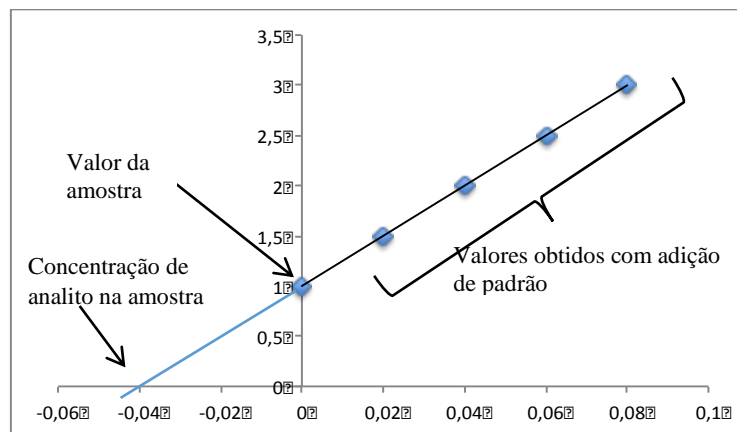


Figura 16 - Representação gráfica da aplicação hipotética do método de adição de padrão.





## 2. Objetivos do trabalho

Tendo em conta a crescente importância da ocorrência, detecção e quantificação da acrilamida em produtos alimentares, as diversas estratégias de mitigação e a complexidade dos métodos de análise existentes, os principais objetivos deste trabalho são:

- a) a aplicação de estratégias para a diminuição do teor de acrilamida em bolachas.
- b) a otimização de um método simples e rápido de extração de acrilamida (de bolachas) usando o método de HS-SPME e o cálculo dos seus limites de detecção e quantificação por GC-qMS.
- c) aplicação deste método em amostras reais, nomeadamente de bolacha.

Usando HS-SPME, um método seletivo e de utilização simples, pretende-se recolher a acrilamida de bolachas sem necessitar de entrar em contacto com a matriz, evitando assim o elevado número de passos de preparação de outros métodos. A amostra será preparada imergindo diretamente a bolacha numa mistura de água e de um solvente orgânico, evitando assim, uma análise morosa. Este trabalho tem em vista a otimização deste novo método. A determinação destas condições será acompanhada pela seleção do tipo de fibra de SPME que possa maximizar a extração da acrilamida. O processo de otimização consistirá na seleção das condições de extração variando parâmetros como: a temperatura, o tempo de termostatização, o tempo de extração, quantidade de solvente orgânico e quantidade de bolacha. Os ensaios para a determinação das melhores condições, utilizando soluções e condições padrão, serão realizados e analisados por GC-FID. Para a quantificação e estudo da influência da matriz em matrizes reais, nomeadamente em bolachas, será utilizado o GC-qMS como técnica cromatográfica e de detecção.



### **3. Materiais e Métodos**



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

Em todos os ensaios utilizando HS-SPME foi usado NaCl (VWR chemicals), acrilamida (>98,0%, Fluka), butiramida (>98%, Fluka) e propanol (99,9% VWR chemicals). Para esta metodologia foi ainda usado um suporte manual de SPME da Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA) e seis tipos diferentes de fibra: Polidimetilsiloxano (PDMS, 100  $\mu\text{m}$  de espessura da fase estacionária), Poliacrilato (PA, 85  $\mu\text{m}$ ), Carbowax/Divinilbenzeno (CW-DVB, 65  $\mu\text{m}$ ), Carboxeno/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS, 75  $\mu\text{m}$ ), Polidimetilsiloxano (PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ ) e Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30  $\mu\text{m}$ ). Estes diferentes revestimentos foram fornecidos também pela Supelco. Foram, diariamente, realizados brancos às fibras para evitar contaminações.

As amostras utilizadas para detecção e quantificação foram: bolacha de aveia “Digestive” (figura 17-A), bolacha de trigo “Maria” (figura 17-B) e batata frita do fundo da fritura (“Saloínha”).



Figura 17 – Embalagens das amostras de bolacha utilizadas: (A) Bolacha de aveia e (B) bolacha “Maria”

## **3.2 Mitigação de acrilamida em bolachas**

No âmbito de uma colaboração transnacional Portugal-Eslováquia, todos os procedimentos experimentais com objetivo à mitigação da acrilamida decorreram nas instalações do *Food Research Institute* (VÚP) em Bratislava, Eslováquia.

### **3.2.1 Preparação das amostras de bolacha**

Foram preparadas bolachas modelo com sacarose ou frutose. Os modelos de bolacha foram preparados seguindo um método internacional de confeção de bolachas (83). Nos modelos com sacarose foi usada a receita completa (Tabela 5). Nos modelos de frutose, para além da substituição da sacarose por frutose, foi usada metade da receita devido à quantidade limitante dos extratos adicionados. Os ingredientes foram sendo adicionados a uma batedeira KitchenAid Model 5KSM150PS (KitchenAid Europa, Inc., Antwerp, Belgium) pela seguinte ordem: em primeiro lugar os ingredientes da categoria A+B (Tabela 5) foram adicionados à batedeira (nível 4), durante 1 min, 3 vezes; em segundo lugar, os ingredientes da categoria CE, 30 s, uma vez (nível 4); em terceiro lugar, os ingredientes da categoria C, 30 s, 2 vezes (nível 4) e por fim, os ingredientes da categoria D, 10 s, 3 vezes (nível 2). Na categoria CE, os extratos adicionados (Tabela 6) foram dissolvidos em metade do volume da água. No caso dos modelos controlo, a categoria CE é englobada na categoria C, sendo toda a água adicionada num só passo. Depois de preparada a massa, as bolachas foram moldadas com um diâmetro de 60 mm e altura de 8 mm, sendo de seguida confeccionadas num forno Miwe Condo (MIWE Michael Wenz GmbH, Arnstein, Germany) a 205°C durante 11 min.

Tabela 5 - Ingredientes e respetiva quantidade usada na formulação dos modelos de sacarose.

<b>Categoria</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (g)</b>
<b>A</b>	Manteiga	32
<b>B</b>	Sal	0,6
<b>B</b>	Leite desnatado (em pó)	0,8
<b>B</b>	Sacarose	25,6
<b>B</b>	Açúcar amarelo	8
<b>B</b>	NaHCO <sub>3</sub>	0,8
<b>CE</b>	Água desmineralizada (variável*) 1/2	9,5
<b>CE</b>	Extrato	
<b>C</b>	Água desmineralizada (variável*) 1/2	9,5
<b>C</b>	HFCS	1,2
<b>C</b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,4
<b>D</b>	Farinha de trigo	80

Tabela 6 - Extratos usados nos modelos de sacarose e frutose.

<b>Extratos com Sacarose</b>	<b>Extratos com Frutose</b>
HMWaq 0,5%	Pectina 5%
HMWaq 0,1%	Pectina desterificada 2%
HMWaq 0,15% + TA 1%	PS 1% + TA 0,2%
	Ácido algínico 2%

HMWaq – Extrato de café obtido como material de alto peso molecular (>100kDa); TA- ácido tartárico; PS – polissacarídeos provenientes de uma salina. A concentração dos extratos está representada em percentagem (%) da massa de farinha utilizada na confeção das bolachas.

Os extratos adicionados (Tabela 6) foram preparados na Universidade de Aveiro ou obtidos comercialmente, como é o caso da pectina, do ácido tartárico (José M.Vaz Pereira Ltd.) e do alginato de sódio (Fluka AG). A pectina foi desterificada em meio ácido (HCl) com acerto de pH com NaOH. Assim, como a pectina, o alginato de sódio foi protonado com a adição de ácido clorídrico (HCl), formando ácido algínico. Devido ao sal formado (NaCl) durante este procedimento, na confeção dos modelos de bolacha com pectina desterificada e ácido algínico, a quantidade de sal a ser adicionada na receita foi ajustada. O extrato de café



(HMWaq) e os polissacarídeos provenientes da salina foram isolados recorrendo a um aparelho de ultrafiltração com uma membrana de porosidade 5 kDa (Labscale, TFF System, Millipore- figura 18) sendo descartado o material de baixo peso molecular. Todos os extratos foram adicionados à massa das bolachas na sua forma sólida.



Figura 18 - Equipamento de ultrafiltração utilizado na extração dos polissacarídeos da salina da Universidade de Aveiro.

Foram efetuadas duas fornadas para cada extrato, cada uma com o respetivo controlo. No forno, os modelos controlo e com adição de extrato foram distribuídos de forma homogénea. A quantidade de massa de cada bolacha foi medida antes de entrar no forno, à saída do forno e uma hora depois de ter saído deste. O pH da massa foi medido com um eletrodo, juntamente com a atividade da água, matéria seca e a cor recorrendo ao método CIE-Lab num equipamento X-RiteColor Master CM2.

### **3.3 Extração da acrilamida**

#### **3.3.1 Extração sólido-liquido**

A amostra de bolacha foi moída no equipamento Knife Mill Grindomix GM200 (Retsch GmbH, Haan, Germany) e 2 g desta foram pesados diretamente num tudo de centrifugação. Foram adicionados a cada tubo de centrifugação 100 µL de padrão interno ( $d_3$ -acrilamida) (2 mg/10 mL 0,1% ácido acético) e 18 mL de ácido acético (0,1%) seguido de agitação. Depois, 1 mL de solução de Carrez I (15 g of  $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$  em 100 mL de água) e 1 mL solução de Carrez II (30 g of  $ZnSO_4 .7 H_2O$  em 100 mL de água) foram adicionados. Depois de misturar no vortex por 30 s, a mistura foi levada ao banho de

ultrassons durante 5 min seguida de centrifugação a 8720 g (10000 rpm) durante 10 min a -5 °C. Retiraram-se 5 mL de sobrenadante e a estes adicionaram-se 5 mL de acetato de etilo e misturou-se bem. A fase de acetato de etilo foi recolhida, e esta extração líquido-líquido repetida mais duas vezes com a adição de 5 mL de acetato de etilo em cada uma das lavagens. As fases de acetato de etilo recolhidas foram evaporadas no evaporador rotativo a 35 °C. O resíduo obtido foi dissolvido em 1 mL de ácido acético (0,1%) e filtrado numa seringa com filtro de nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro.

A curva de calibração foi construída diluindo a solução de acrilamida (500 µg em 100 mL de ácido acético 0,1%) numa gama de 10-2000 ng/10 mL de ácido acético (0,1%) e com 50 µL de padrão interno (d3-acrilamida) (2 mg em 10 mL ácido acético 0,1%).

### **3.3.2 Extração por HS-SPME**

#### **3.3.2.1 Otimização**

- **Seleção da fibra de SPME**

Seis diferentes fibras foram testadas com soluções padrão de acrilamida e butiramida, com o objetivo de comparar as suas capacidades de extração e reprodutibilidade. A extração por HS-SPME foi realizada num frasco selado de 120 mL (SCHOTT Duran) usando 20 mL de propanol, 18 mL de água destilada, 1 mL de solução de acrilamida (5,05 mg/mL) e 1 mL de solução de butiramida (5,06 mg/mL), 5 g de NaCl e um magnete (4 x 0,9 cm) com uma rotação de 200 rpm. O sistema foi aquecido num banho de imersão a 40 °C e mantido a termostatar durante 45 min, sendo a fibra inserida no final deste período. O tempo de extração com a fibra foi de 15 min, perfazendo 1 h no total. Depois de recolhida a fibra, esta foi inserida 3 min no GC-FID, onde a amostra foi separada e analisada. Para cada revestimento foram realizados pelo menos três réplicas. A análise estatística foi realizada no programa *Graphpad Prism 5.0*.

- **Otimização das condições da extração SPME**

Os ensaios realizados com o objetivo de determinar as condições mais favoráveis para a extração foram efetuados com a fibra CAR-PDMS (75  $\mu\text{m}$  de espessura), num frasco selado de 120 mL, contendo 5 g de NaCl, um agitador (4 x 0,9 cm) com uma rotação de 200 rpm, 1 mL de solução de acrilamida (5,05 mg/mL) e 1 mL de solução de butiramida (5,06 mg/mL). A temperatura (T), o tempo de termostatização/exposição (t) e o rácio água:propanol (r), foram os fatores escolhidos para otimização e codificados em três níveis (Tabela 7) dentro do intervalo de condições usadas em SPME. Este fatores foram sendo variados entre os diferentes ensaios de acordo com o desenho experimental Box-Behnken (Tabela 8). Os dados foram processados no programa *Unsrabler 9.7* onde foi efetuada uma análise ANOVA para estudar a significância de cada fator.

Tabela 7 - Fatores escolhidos para a otimização da extração por HS-SPME em três níveis.

Fator	Nível		
	Mínimo (1)	Médio (1,5)	Máximo (2)
T (°C)	40	50	60
r(água:propanol) (mL:mL)	10:30	20:20	30:10
t (term/exp) (min/min)	15:45	30:30	45:15

Tabela 8 - Plano de experiências determinado pelo desenho experimental Box-Behnken.

Experiência	T (°C)	r(água:propanol) (mL:mL)	t(term/exp) (min/min)
1	1	1	2
2	2	1	1,5
3	1	2	1,5
4	2	2	1,5
5	1	1,5	1
6	2	1,5	1
7	1	1,5	2
8	2	1,5	2
9	1,5	1	1
10	1,5	2	1
11	1,5	1	2
12	1,5	2	2
13	1,5	1,5	1,5

A temperatura foi variada entre 40 e 60 °C, o rácio água:propanol entre 10:30 e 30:10 (mL:mL) sempre perfazendo um total de 40 mL, e o tempo de termostatização/exposição variado entre 15:45 e 45:15 (min/min), perfazendo sempre um total de 1 h. Os intervalos foram escolhidos de acordo com as limitações do método: temperaturas inferiores a 40 °C são difíceis de controlar e não favorecem a extração, por outro lado temperaturas superiores a 60 °C podem levar à formação de outras substâncias ou à alteração dos analitos. O volume da mistura água:propanol foi sempre de 40 mL, respeitando a razão de 1/3 de volume de amostra para espaço de cabeça normalmente utilizado em HS-SPME. No que diz respeito ao tempo de termostatização e tempo de extração, estes juntos não ultrapassaram os 60 min por razões práticas, visto que mais do que uma hora iria tornar este método demasiado longo, o que iria contra o objetivo inicial de desenvolver um método rápido.

- **Seleção da quantidade de bolacha**

As quantidades de bolacha testadas foram 1, 2 e 3 g, com pelo menos três réplicas para cada massa. A amostra, previamente triturada num almofariz, foi adicionada ao frasco de HS-SPME selado de 120 mL. Neste frasco foram também adicionados 5 g de NaCl, um agitador (4 x 0,9 cm) (rotação de 200 rpm), 1 mL de solução de acrilamida (5,05 mg/mL) e 1 mL de butiramida (5,06 mg/mL) e 8 mL de água destilada. A mistura foi levada 15 min ao banho de ultrassons. Posteriormente, foi adicionado o propanol (30 mL) ao frasco de HS-SPME e a amostra levada novamente 15 min ao banho de ultrassons. Depois destes dois primeiros passos, o frasco foi imerso num banho de água a 60 °C, estando 15 min em termostatização e 45 min com a fibra exposta. A fibra foi deixada durante 3 min no injetor do GC-FID.

- **Calibração externa e estudo da influência da variação do rácio água:propanol**

Os ensaios realizados para a obtenção dos pontos da curva de calibração externa e para o estudo da influência da variação do rácio água:propanol foram efetuados usando uma solução padrão de acrilamida e butiramida (uma solução de 10,5 mg/L e 10,2 g/L, respetivamente). No frasco de 120 mL de HS-SPME foram colocados 5 g de NaCl, um agitador (4 x 0,9 cm) com uma rotação de 200 rpm e 30 mL de propanol. A quantidade de solução de padrão adicionada variou com a concentração desejada, perfazendo com água destilada 10 mL. A mistura foi imersa num banho de água a 60 °C e decorridos 15 min foi inserida a fibra CAR-PDMS no espaço de cabeça do frasco durante 45 min. Depois de exposta na fibra para desadsorção durante 3 min no injetor, a amostra foi separada e analisada em GC-qMS.

### **3.3.2.2 Cálculo dos limites de deteção (LoD) e quantificação (LoQ)**

O cálculo dos limites de deteção e quantificação foi efetuado recorrendo à fórmula:  $LoD/LoQ = FxSD/b$  (84). O valor  $F$  é definido como o fator de 3,3 e 10, para o limite de deteção e quantificação, respetivamente.  $SD$  é o desvio padrão do branco e  $b$  o declive da reta de calibração.

### **3.3.2.3 Outras condições**

- **Influência do tempo de extração**

Os ensaios realizados para a obtenção dos pontos do estudo da influência do tempo de extração foram efetuados usando uma solução padrão de acrilamida (AA) e butiramida (10,5 mg/L e 10,2 mg/L, respetivamente). Num frasco de 120 mL foram inseridos 30 mL de propanol, colocado um agitador (4 x 0,9 cm) com uma rotação de 200 rpm, 5 g de NaCl, 1 mL de solução de padrão (uma concentração de 10,5 µg AA/frasco) e 9 mL de água destilada, perfazendo os 10 mL. A mistura foi imersa num banho de água a 60°C. Decorridos 15 min de termostatização, foi inserida a fibra CAR-PDMS no espaço de cabeça do frasco durante 45

min, 4, 14 e 38 h. Depois de a fibra exposta durante 3 min no injetor, a amostra foi separada e analisada em GC-qMS.

#### **3.3.2.4 Amostras reais**

- **Bolacha de Aveia e Bolacha de trigo “Maria”**

Os ensaios realizados para a obtenção dos pontos das respectivas curvas de calibração interna foram efetuados segundo o método de adição de padrão usando uma solução contendo padrões de acrilamida e butiramida (10,5 mg/L e 10,2 mg/L, respectivamente). Foram inseridos no frasco de HS-SPME selado de 120 mL contendo, um agitador (4 x 0,9 cm) a uma rotação de 200 rpm, 5 g de NaCl, 1 g de bolacha de aveia ou de trigo moída, água e o padrão (figura 19, passo 1). A quantidade de solução de padrão adicionada variou com a concentração desejada, perfazendo os 10 mL com água destilada. Depois deste primeiro passo, a mistura foi levada durante 15 min ao banho de ultrassons (figura 19, passo 2). Posteriormente, foi adicionado o propanol (30 mL) (figura 19, passo 3) e a amostra levada novamente 15 min ao banho de ultrassons (figura 19, passo 4). Depois destes dois primeiros passos, o frasco foi imerso num banho de 60 °C, estando 15 min em termostatização (figura 19, passo 5) e 45 min em exposição (figura 19, passo 6). Todos estes passos foram conduzidos no mesmo frasco de HS-SPME. Por fim, a fibra foi inserida no injetor do GC-qMS (figura 19, passo 7) durante 3 min.

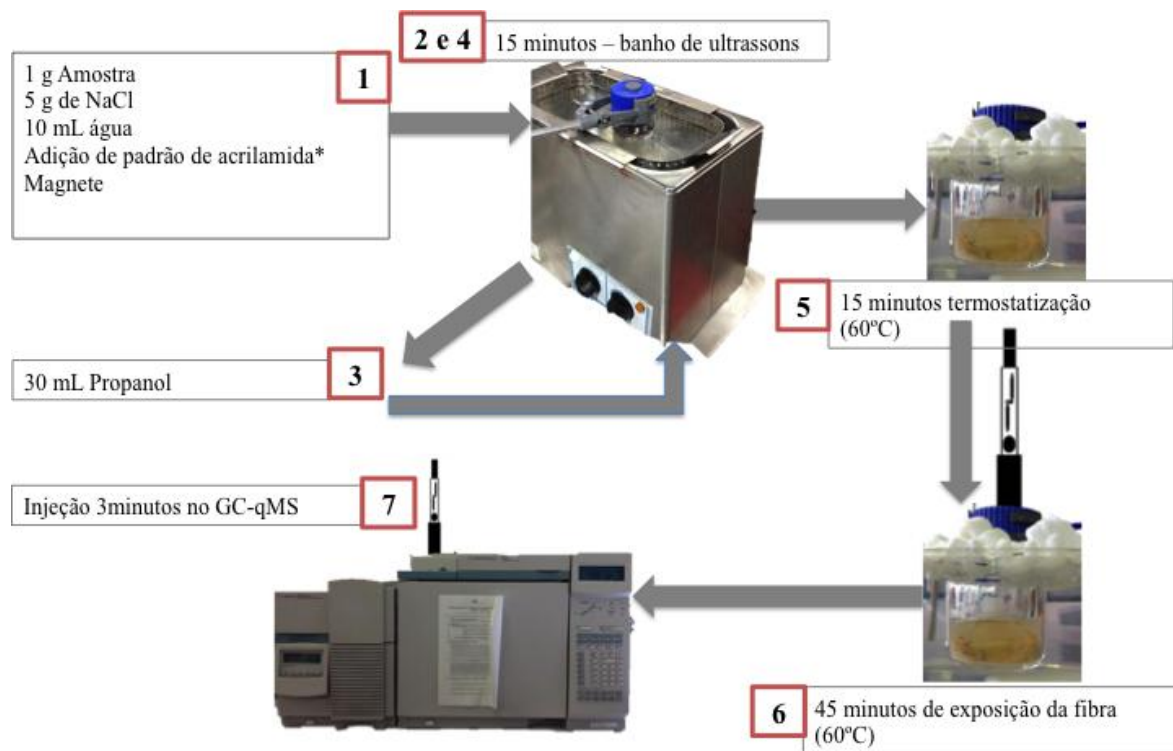


Figura 19 - Esquema do procedimento de extração (HS-SPME) e análise (GC-qMS) das amostras de bolacha.

- **Amostra de batata frita**

Depois dos ensaios com bolacha, e sabendo que as batatas fritas estão entre os alimentos com maior teor de acrilamida (3, 51, 57), testou-se a aplicabilidade deste método numa amostra de batata frita de pacote (*potato chips*) da fábrica da marca Saloinha. A batata selecionada, ao contrário da batata que chega ao consumidor, de cor mais amarelada e seca, é do fundo da frigideira industrial e possui uma cor castanha escura contendo provavelmente uma quantidade mais elevada de acrilamida (85). Esta amostra contém, cerca de 60% de gordura na sua constituição devido ao facto de permanecer no fundo da fritadeira. A escolha deste tipo de batata foi motivada pelos elevados valores de acrilamida esperados. Esta amostra chegada da fábrica já em pequenos sólidos (figura 20), sofreu o mesmo tratamento representado na figura 19 para as bolachas.



Figura 20 - Amostra de batata frita do fundo da fritadeira.

### **3.4 Metodologias de Detecção**

#### **3.4.1 LC-MS**

A análise por cromatografia líquida associada a espectrometria de massa (LC-MS) foi realizada num HPLC 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) acoplado a um Agilent 6410 Triplo Quadrupolo equipado com ionização electro-spray (ESI). A separação decorreu à temperatura ambiente numa coluna Purospher STAR RP-8ec (150 mm × 4,6 mm, 3 µm de tamanho das partículas) (Merck, Darmstadt, Germany) usando uma mistura isocrática de 100 mL de acetonitrilo e 900 mL de uma solução aquosa de PFOA (0,05 mM) com um fluxo de 0,5 mL/min.

#### **3.4.2 GC-FID**

Nos ensaios de otimização das condições de HS-SPME, a fibra foi introduzida manualmente na porta de injeção do GC e mantida durante 3 min para desadsorção. A separação decorreu num cromatografo de gás PerkinElmer Clarus 400 (figura 21) equipado com uma coluna DB-FFAP (30 m x 0,32 mm diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme, J&W Scientific, Folsom, CA, USA). O gás de arraste usado foi o hidrogénio. A temperatura do forno foi programada da seguinte maneira: 60 °C durante 1 min, uma primeira rampa de 20 °C/min até aos 120 °C, uma segunda rampa de 2 °C/min até aos 140 °C e finalmente uma rampa de 20 °C/min até aos 250 °C, mantidos durante 2 min. A corrida teve a duração total de 21,5 min.





Figura 21 - Cromatógrafo de gás com detetor de ionização de chama (GC-FID).

### 3.4.3 GC-qMS

Tanto em ensaios com soluções padrão (calibração externa, estudos da influência do rácio água:propanol e do tempo de exposição), como nos ensaios com amostras reais, a fibra CAR-PDMS foi introduzida manualmente no GC-qMS (figura 22) e mantida durante 3 min a 250°C. A injeção foi feita em modo *splitless*. Os compostos foram separados num cromatógrafo de gás (Agilent Technologies 6890N Network) com uma coluna DB-FFAP (60 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme J&W Scientific, Folsom, CA, USA) acoplado a um detetor de massa (Agilent 5973N). O gás de arraste usado foi hélio com um fluxo de 1,7 mL/min. A temperatura do forno foi programada da seguinte maneira: 60 °C durante 1 min, aumentada a 20 °C/min até 120°C, uma segunda rampa a 3 °C/min até 140°C e por fim uma terceira rampa de 20 °C/min até aos 250°C, temperatura que se manteve durante 2 min. A corrida teve a duração de 18 min.



Figura 22 - Cromatógrafo de gás acoplado com espectrômetro de massa com quadropólo (GC-qMS).

Para o sistema MS, este foi operado em modo de impacto de elétron (EI) a 70 eV. A temperatura da linha de transferência, quadropolo e fonte de ionização foram 250°C, 150°C e 250°C, respectivamente. Uma primeira injeção foi efetuada em *full scan* com vista à identificação dos picos, dos seus iões moleculares e dos tempos de retenção (figura 23). As aquisições foram feitas em modo MIM (*Multiple Ion Monitoring*) (59 e 71 *m/z*, ião mais abundante para a butiramida e acrilamida, respectivamente). A aquisição do sinal e o processamento dos dados foram feitos pelo programa HP Chemstation (Agilent Technologies).

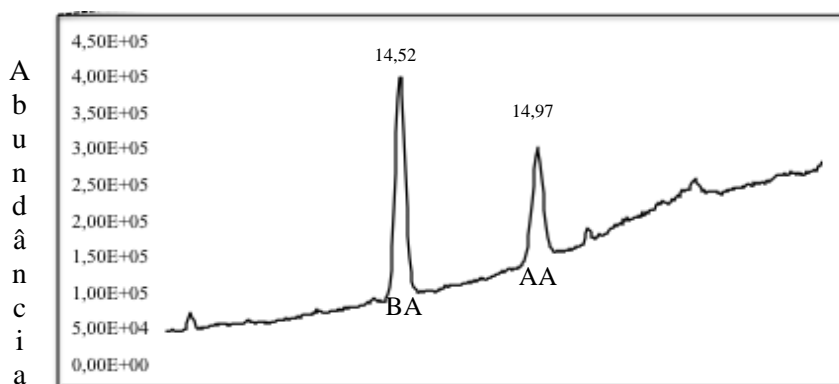


Figura 23 - Cromatograma obtido por GC-qMS com 500 µg/frasco de acrilamida (AA) e butiramida (BA) e respectivos tempos de retenção (min).



## **4. Resultados e Discussão**



## 4. Resultados e discussão

Este trabalho tem como base o estudo da presença de acrilamida em produtos alimentares, incluindo a aplicação de estratégias de mitigação e o desenvolvimento de um método para a sua extração de bolachas utilizando a metodologia de HS-SPME e quantificação usando GC-qMS.

### 4.1 Estratégias de mitigação em bolachas

Na continuação de projetos anteriores decorrentes da colaboração Portugal-Eslováquia, a aplicação de estratégias de mitigação de acrilamida em bolachas foi efetuada em Bratislava, Eslováquia, no Food Research Institute (VÚP). Foram elaboradas bolachas com a adição de diferentes extratos de origem natural e analisadas posteriormente no que diz respeito ao seu teor de acrilamida. Os extratos foram escolhidos tendo em vista as suas propriedades químicas, características estas que pudessem contribuir para a diminuição do teor de acrilamida em bolachas sem afetar as suas propriedades organolépticas.

**Extrato concentrado de Vinho (Wine PpEt).** No início do projeto de cooperação Portugal-Eslováquia foi testada uma amostra concentrada de vinho (Wine PpEt) na formulação de bolachas de sacarose. A adição deste extrato de cor escura levou à diminuição do pH e contribuiu para um decréscimo dos níveis de acrilamida. No entanto, levou também a uma alteração significativa (negativa) das propriedades sensoriais das bolachas (dados não publicados). Sabendo que o principal regulador de pH existente no vinho é o ácido tartárico (TA) (86), um ácido diprótico, foi também testada a influência deste na formação de acrilamida, na hipótese deste ser o principal composto responsável pela mitigação observada neste extrato de vinho. Efetivamente, o ácido tartárico mostrou-se um bom agente de mitigação de acrilamida. No entanto, levou a uma descoloração das bolachas aquando da adição deste composto às bolachas (dados não publicados).

**Extrato de café de elevado peso molecular (HMWaq).** Este extrato, preparado na Universidade de Aveiro, era rico em compostos antioxidantes (87). Adicionalmente, teve um efeito significativo na cor das bolachas, para tonalidades mais escuras em relação aos

controles, não alterando a concentração de acrilamida em bolachas de sacarose em adições testadas até 10% (dados não publicados).

Já durante este trabalho, testou-se a utilização combinada de extratos de café (HMWaq) e ácido tartárico, numa tentativa de modulação dos efeitos na cor e na mitigação da acrilamida, respetivamente, pela presença destes dois extratos. Testaram-se concentrações de 0,1% e 0,5% de extrato HMWaq avaliando o efeito desta adição no pH, na concentração de acrilamida presente nas bolachas e na cor das mesmas. Nas figuras 24 e 25 é possível observar que não houve alteração no valor de pH e, conseqüentemente, no teor de acrilamida a aquando da adição dos extratos de café. Já na adição combinada dos dois extratos de café e ácido tartárico (HMWaq 0,15% + TA 1%), observou-se um efeito de redução do pH (figura 24) que conseqüentemente, levou a uma diminuição efetiva da concentração de acrilamida nas bolachas (figura 25).

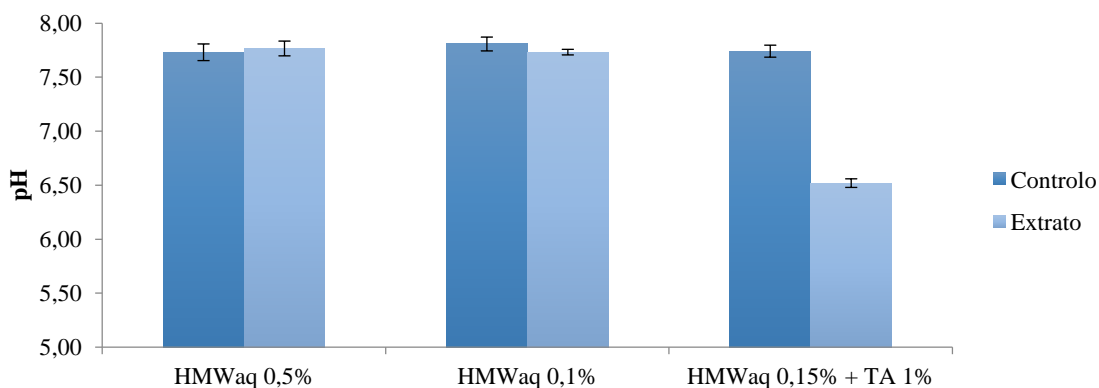


Figura 24 - Representação gráfica do pH da massa das bolachas em função dos extratos adicionados.

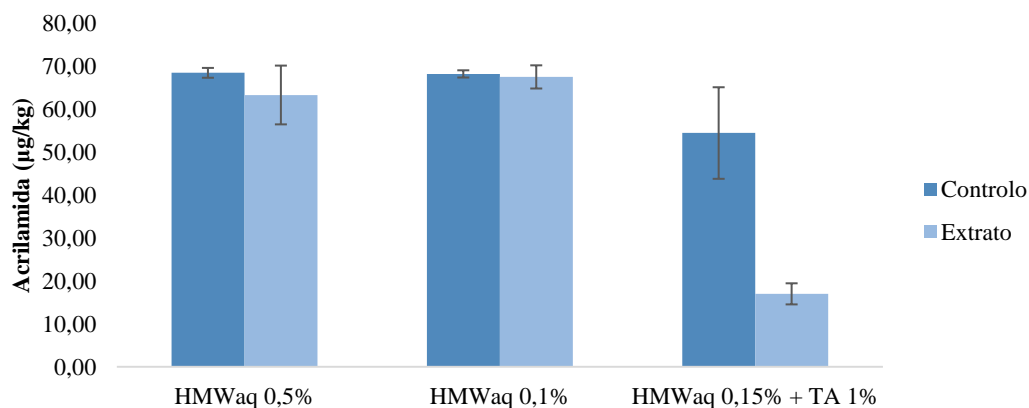


Figura 25 - Representação gráfica da concentração de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em função dos extratos adicionados.

Quanto à cor, por análise de CIELab ( $L^*a^*b^*$ ), observou-se um escurecimento em relação aos modelos controlo pela adição de extratos de café (anexo - tabelas 12 e 13), confirmado pela diminuição do valor de L em relação ao respetivo controlo ( $L=100$  corresponde a branco e  $L=0$  corresponde a preto). O mesmo comportamento foi observado quer na parte superior, quer na parte inferior das bolachas. Quanto ao efeito pretendido na cor das bolachas pela adição combinada de extrato de café e ácido tartárico (HMWaq 0,15% + TA 1%), esta estratégia falhou na aproximação da cor dos modelos com extratos à cor dos controlos, revelando uma distribuição de cor não homogénea, tal como pode ser observado na figura 26.

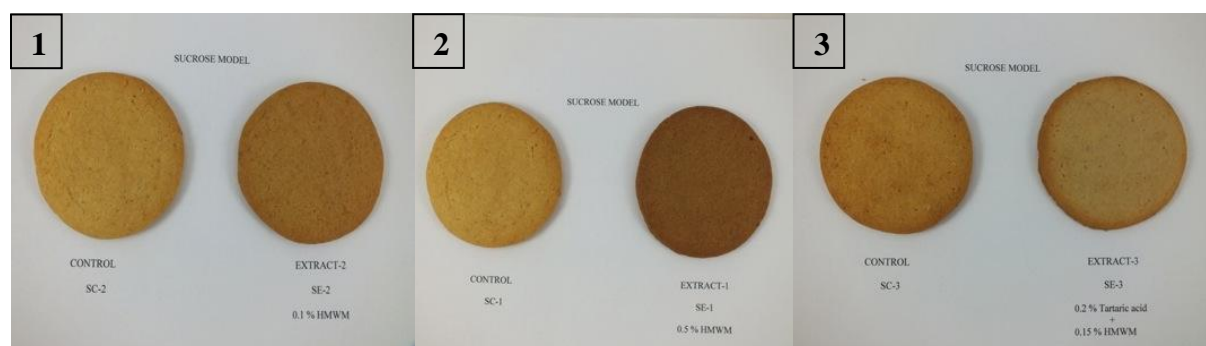


Figura 26 - Cor dos modelos de bolacha em comparação com os respetivos controlos: (1) extrato de café (0,1%), (2) extrato de café (0,5%) e (3) conjugação de extrato de café (0,15%) com ácido tartárico (0,1%).



**Pectina.** Rydberg *et al.* (19) demonstram a influência do pH aquando da utilização de ácidos orgânicos como agente de mitigação, tal como demonstrado anteriormente com o uso de ácido tartárico. No seguimento desta hipótese, foi também ponderada a possível utilização de polissacarídeos, cujos resíduos constituintes apresentassem grupos ácidos. Assim, foi também testada uma pectina comercial, extraída de citrinos (50% metilesterificada), cujos resíduos de ácido galacturónico pudessem contribuir para a diminuição do pH. A utilização da pectina em bolachas de sacarose (5% em relação à massa de farinha), levou efetivamente a uma diminuição do pH e contribuiu para uma mitigação em cerca de 67,5% no valor da acrilamida em relação ao controlo (figura 27) (dados não publicados).

Já durante este trabalho, a influência da adição da pectina foi testada em bolachas de frutose usando a mesma percentagem do trabalho anterior (5%). As bolachas com frutose, desenvolvidas nomeadamente para diabéticos, contêm maior quantidade de acrilamida quando comparadas com as bolachas confeccionadas com sacarose devido à maior reatividade da frutose na sua participação na reação de Maillard. Na figura 27 pode-se observar o aumento na concentração de acrilamida obtida nos controlos com frutose aquando da substituição da sacarose pela frutose.

A adição de pectina (5%) nas bolachas de frutose provocou uma diminuição em 81,7% no teor de acrilamida quando comparado com o controlo (figura 27), efeito comparável ao já observado para as bolachas com sacarose. Mais ainda, a diminuição do teor de acrilamida em bolachas de frutose, pela adição de pectina, permitiu uma diminuição do teor de acrilamida para os valores encontrados nos modelos (controlo) de bolachas com sacarose.

A adição de pectina levou a uma diminuição significativa do pH da massa das bolachas de 7,6 para 6,8 (figura 28), sabendo-se que a acrilamida se forma maioritariamente a pH 8 (19). A diminuição do pH observada pela utilização da pectina mostrou-se eficaz na diminuição do teor de acrilamida formado. Mais uma vez, comprovou-se uma relação entre a mitigação da acrilamida em bolachas e o efeito dos extratos no pH da massa. Adicionalmente, observou-se que a adição da pectina, ao contrário do ácido tartárico, não contribuiu para uma alteração das propriedades sensoriais das bolachas (a nível do sabor e cor), o que sugere a possível utilização da pectina como agente de mitigação.

Sabendo que a pectina comercial utilizada apresentava 50% de metilesterificação, foi também testada a hipótese de utilizar esta pectina após ser submetida a uma desesterificação. Este passo permitiu duplicar a quantidade de grupos carboxílicos livres e, por isso, reduzir a metade a quantidade de pectina a ser utilizada para o mesmo efeito no pH (figura 28) e, conseqüentemente, na mitigação do teor de acrilamida (figura 27). Por comparação com o número de grupos ácidos presentes no ácido tartárico, optou-se pela adição de 2% de pectina desesterificada, o que corroborou a percentagem de mitigação observada (proporcionalmente inferior à que seria observada se utilizando 2,5% de pectina desesterificada).

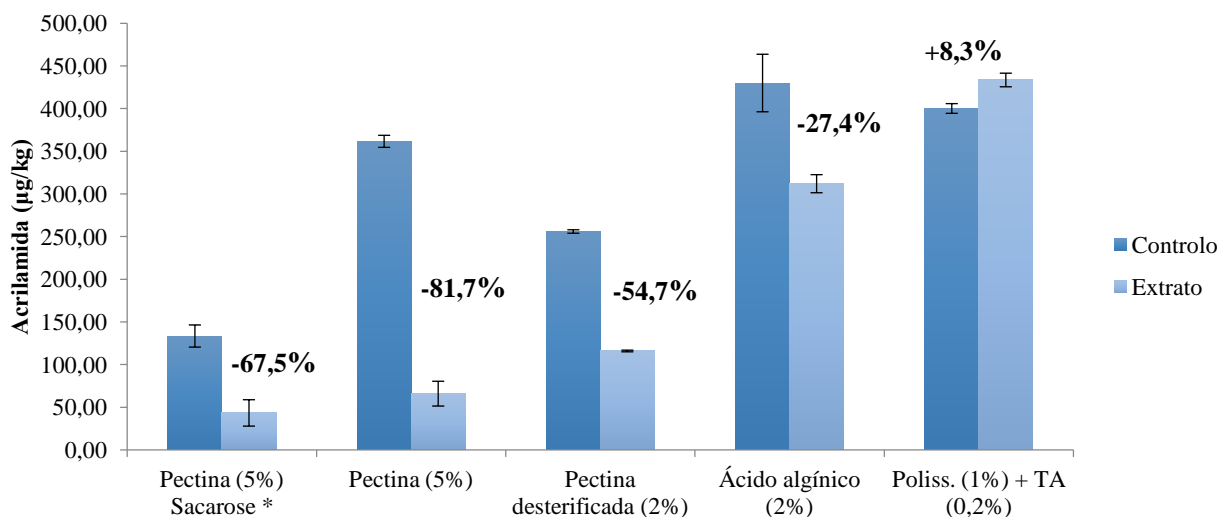


Figura 27 - Valores de acrilamida encontrados nos controlos e respetiva adição de extratos no modelo de bolachas com frutose. \*O ensaio com pectina (5%) em bolachas de sacarose foi efetuado em trabalhos anteriores.

**Outras fontes de polissacarídeos.** Foi também testada a hipótese de utilização do ácido algínico, um polímero extraído da parede celular de algas castanhas (88). Esta hipótese surgiu pela semelhança com a pectina em termos de composição em grupos carboxílicos, para além da vantagem de ser comercialmente mais económica. Em termos de resultados, observou-se que a adição do ácido algínico levou também a uma diminuição da concentração de acrilamida (27,4%), mas tendo em conta o mesmo número de grupos ácidos disponíveis que a pectina desesterificada (na mesma proporção de 2% de adição), a ação deste extrato ficou abaixo do esperado. Este efeito foi verificado quer a nível da mitigação no teor de acrilamida (figura 27) quer mesmo em termos de diminuição do valor de pH (figura 28).

Tendo sido utilizado um extrato de alginato de sódio comercial, pondera-se a hipótese de existência de uma contribuição residual em açúcares livres (que participam na reação de Maillard a favor da formação de acrilamida) e que podem estar na origem da diminuição abaixo do esperado (figura 27). Sabendo que a presença de açúcares livres, pode contribuir negativamente no processo de mitigação, sendo necessária a adição de um passo de purificação para remoção destes açúcares livres.

Foi também testada a utilização de um extrato constituído por polissacarídeos purificados a partir da água da salina da ria de Aveiro (com cerca de 20% de resíduos de ácidos urónicos) utilizando um processo de ultrafiltração (>5 kDa). Desta forma, foi também possível excluir a hipótese de existência de açúcares livres neste extrato. No entanto, o pouco rendimento de material obtido, não permitiu a utilização deste extrato diretamente nos modelos com bolachas utilizados. Alternativamente, optou-se pela conjugação de 1% deste extrato com 0,2% de ácido tartárico. A utilização deste extrato combinado teve um ligeiro efeito na diminuição do pH (figura 28). No entanto, não foi observado qualquer efeito de mitigação no teor de acrilamida, observando-se mesmo um ligeiro aumento em 8,3% (figura 27). Mais ainda, sabendo que a presença do ácido tartárico sozinho leva a uma diminuição da acrilamida, pondera-se a hipótese do extrato de polissacarídeos purificado da água da salina ter um efeito de aumento do teor de acrilamida. Tendo apenas conhecimento de 20% da composição deste extrato, o efeito observado poderá dever-se à presença de outras moléculas não identificadas que participem na reação de Maillard a favor da formação de acrilamida. A hipótese de existência de açúcares livres pode ser excluída devido ao tratamento por ultrafiltração onde estes são removidos.

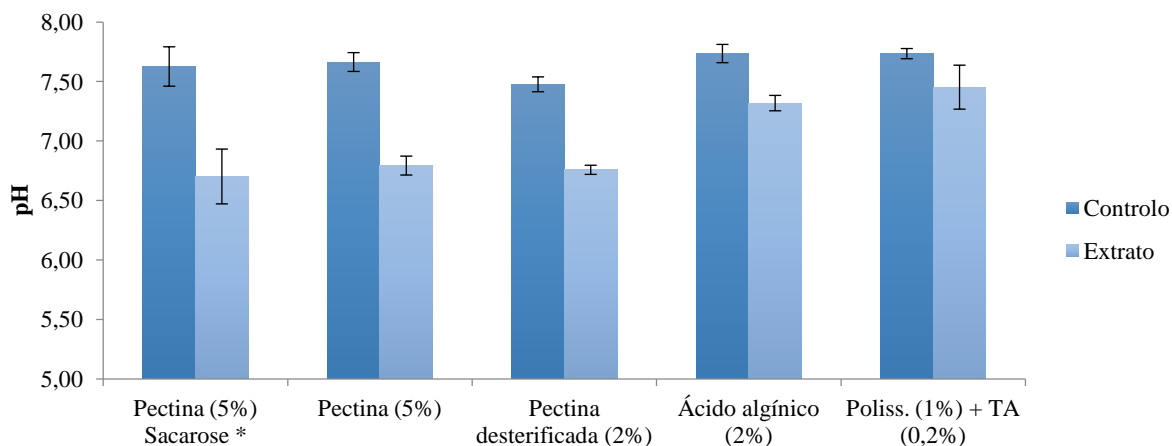


Figura 28 - Valores de pH da massa de bolachas com adição de extratos de café e respetivos modelos controlo.

## 4.2 Método de extração de acrilamida por HS-SPME-GC-FID

A eficiência da extração *Head Space Solid Phase Microextraction* (HS-SPME) depende de vários parâmetros experimentais tais como: o tipo de fibra, o tempo de termostatização/extração, temperatura, quantidade de sal (força iónica), concentração da amostra e a relação entre o volume do espaço de cabeça e o volume total do frasco (49, 66, 70). Destes parâmetros foram estudados o tipo de fibra, assim como os parâmetros experimentais: tempo de extração (t), temperatura (T), e solvente de extração através da variação do rácio água: propanol (r).

Em todos os ensaios com adição de acrilamida foi também adicionada a mesma quantidade de butiramida, que pela semelhança estrutural com a acrilamida, foi usada para monitorização e como possível padrão interno.

#### 4.2.1. Seleção da fibra de SPME

Efetuada extrações por HS-SPME, o tipo de fibra é de extrema importância pois é no seu revestimento que vão ser absorvidos/adsorvidos os compostos de interesse. Portanto, o primeiro passo para otimização deste método foi a seleção da fibra. Para a escolha da melhor fibra a utilizar foram realizados ensaios com soluções padrão com a mesma concentração de acrilamida e butiramida e nas mesmas condições experimentais para comparação da eficiência entre fibras. Os primeiros ensaios foram efetuados utilizando a fibra DVB/CAR-PDMS. Sendo esta uma fibra mista de largo espectro, é uma das fibras mais utilizadas em HS-SPME. Nesta fase, as condições experimentais aplicadas a todas as fibras incluíram: tempo de termostatização/extração (45/15 min), temperatura (40°C) e rácio de água:propanol (20:20 mL). Nestas condições, todas as fibras disponíveis no laboratório foram testados com pelo menos três réplicas cada. Foram testados os seguintes tipos de fibra: DVB/CAR-PDMS, PDMS, CW-DVB, PA, PDMS-DVB e CAR-PDMS (para mais informação sobre a fibra ver Tabela 4, secção 1.2.1.1). A figura 29 apresenta os valores obtidos para cada fibra. As fibras CW-DVB e CAR-PDMS apresentaram os melhores resultados com áreas cromatográficas estatisticamente superiores às restantes fibras testadas, mas sem diferenças estatisticamente significativas entre si. A utilização da fibra CW-DVB, constituída por um revestimento polar, indicada para compostos polares nos quais a acrilamida se insere, por não se encontrar comercialmente disponível, foi descartada. A fibra PDMS (100 µm), já utilizada em outros estudos da literatura para extração de acrilamida derivatizada por HS-SPME (49), apresentou um resultado estatisticamente não significativo em relação à fibra CAR-PDMS, mas revelou-se inadequada devido à grande variabilidade que apresentou. Já a fibra PA, com um comportamento semelhante à fibra PDMS mostrou-se inadequada na presença de grandes quantidades de propanol. As fibras DVB/CAR-PDMS e PDMS-DVB apresentaram resultados estatisticamente inferiores. Este comportamento apresenta similaridades quando comparado com os valores encontrados na literatura para a extração de acrilamida por imersão direta (DI-SPME), cujo perfil para as fibras com maior afinidade com a acrilamida foi determinado como sendo: CW-DVB>CAR-PDMS>PA (por ordem decrescente de eficiência de extração) (50). A butiramida obteve um comportamento idêntico à acrilamida para cada fibra.

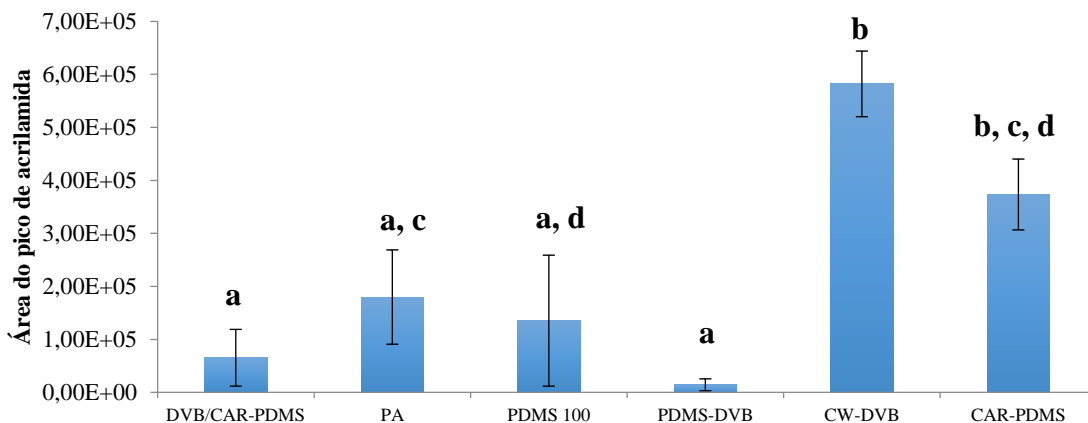


Figura 29 – Área dos picos de acrilamida em função dos diferentes tipos de fibra testados. Diferentes letras identificam diferenças significativas entre cada tipo de fibra testada. PDMS- polidimetilsiloxano; PA- poliácrlato; CAR-PDMS – carboxeno-PDMS; PDMS-DVB – PDMS-divinilbenzeno; CW-DVB – carbowax-DVB.

A fibra a CAR-PDMS que pela sua constituição é indicada para compostos de baixo peso molecular ( $C_2-C_{12}$ ) (89), nos quais a acrilamida se insere, revelou-se a mais apropriada e foi por isso selecionada para levar ao cabo o restante processo de otimização.

#### 4.2.2 Otimização das condições HS-SPME por resposta de superfície (RSM)

A utilização de ferramentas estatísticas tais como o desenho experimental e o tratamento dos resultados por análise da resposta de superfície tem permitido diminuir significativamente o número de experiências a realizar e uma escolha mais assertiva das condições ótimas. O uso da metodologia de resposta de superfície foi usado no contexto deste trabalho para a seleção das condições ótimas de extração da acrilamida pelo método de HS-SPME em soluções modelo que possam simular a extração deste composto de matrizes alimentares, nomeadamente de bolachas.

Na Tabela 9 encontram-se representadas as áreas da acrilamida obtidas com cada condição testada (três réplicas) cujas combinações de fatores (Tabela 7, secção 3.3.2.1) foram

definidas na Tabela 8 (secção 3.3.2.1) pela aplicação de um desenho experimental do tipo Box-Behnken.

Tabela 9 - Plano de experiencias determinadas pelo desenho experimental Box-Behnken e as áreas obtidas de acrilamida para cada condição.

Experiencia	T (°C)	r(água:propanol) (mL)	t(term/exp) (min)	Área Acrilamida	Área média Acrilamida	Erro relativo (%)
1	40	10:30	30:30	3,29E+05 4,93E+05 2,78E+05	3,67E+05	30,6
2	60	10:30	30:30	1,73E+06 6,74E+05 6,20E+05	1,01E+06	62,1
3	40	30:10	30:30	6,96E+04 7,96E+04 7,70E+04	7,54E+04	6,9
4	60	30:10	30:30	2,45E+05 1,01E+05 2,20E+05	1,89E+05	40,8
5	40	20:20	15:45	6,70E+05 7,97E+05 1,33E+06	9,32E+05	37,6
6	60	20:20	15:45	1,34E+06 4,63E+05 2,16E+05	6,73E+05	87,8
7	40	20:20	45:15	3,01E+05 4,33E+05 3,86E+05	3,73E+05	17,9
8	60	20:20	45:15	2,24E+05 4,23E+05 4,99E+05	3,82E+05	37,2
9	50	10:30	15:45	1,06E+06 1,09E+06 4,36E+05	8,62E+05	42,8
10	50	30:10	15:45	1,45E+05 3,23E+05 1,35E+05	2,01E+05	52,6
11	50	10:30	45:15	1,65E+05 1,19E+05 2,61E+05	1,82E+05	39,9
12	50	30:10	45:15	4,43E+04 1,39E+05 6,78E+04	8,37E+04	58,9
13	50	20:20	30:30	1,88E+06 6,75E+05 1,62E+06	1,15E+06	45,6

T- temperatura, r- rácio água:propanol e t-tempo

Depois da introdução dos dados da Tabela 9 no programa *Unscramble 9.7*, uma análise ANOVA foi efetuada para estudar a significância de cada fator. Os resultados desta análise encontram-se na Tabela 10, onde estão representados os valores de  $p$  para: o modelo, para cada variável individualmente e para as interações entre as variáveis, assim como os respectivos coeficientes B. Assume-se que tanto o modelo como as variáveis são estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  para um intervalo de 95% de confiança (representação a negrito na Tabela 10).

Tabela 10 - Coeficientes de regressão e  $p$ -values para cada fator de resposta de superfície.

Variável	Coefficiente-B	$p$ -value
<b>Modelo</b>	-	<b>0,0163</b>
$X_T$	1,260E+05	0,4415
$X_r$	-4,674E+05	<b>0,0068</b>
$X_t$	-4,119E+05	<b>0,0158</b>
$X_T X_r$	-8,338E+04	0,25667
$X_T X_t$	4,232E+04	0,5619
$X_r X_t$	8,890E+04	0,2272

**T- temperatura, r- rácio água:propanol e t-tempo**

Para a temperatura (T) o coeficiente B é positivo, o que indica que a tendência é positiva, isto é, quanto maior o valor de  $X_T$  maior a quantidade de acrilamida extraída. No entanto, sendo o valor de  $p > 0,05$ , a temperatura não é estatisticamente significativa. No caso do rácio água:propanol (variável  $X_r$ ), o valor de  $p$  (0,0068) é muito inferior a 0,05 e por essa razão pode concluir-se que este é um fator estatisticamente significativo. Como o coeficiente B é negativo, significa que a extração é tanto maior quanto maior a quantidade de propanol. Dentro dos três níveis testados (Tabela 7, secção 3.3.2.1), a melhor condição é portanto 10:30 mL de água: propanol. No caso do tempo de termostatização/exposição (variável  $X_t$ ), o valor de  $p$  (0,0158) mostra que este é também um fator estatisticamente significativo. Mais ainda, com um coeficiente B negativo, a diminuição do tempo de termostatização (aumento proporcional do tempo de exposição da fibra), leva ao aumento da quantidade de acrilamida extraída. Não se observam efeitos significativos de interação cruzada entre os fatores ( $X_T X_r$ ,  $X_T X_t$ , e  $X_r X_t$ ). Analisadas as significâncias de cada fator individualmente, é também possível observar as tendências através dos gráficos de resposta de superfície bidimensionais e



tridimensionais, tal como se apresentam respetivamente na figura 30. A figura 30 apresenta o comportamento com o tempo de extração em função do rácio (os dois fatores considerados como estatisticamente como significativos) para uma temperatura fixa de: a) 40°C e b) 60°C, respetivamente. Apesar do resultado global apresentado através dos coeficientes de regressão na Tabela 10, a análise à figura 30 mostra diferentes comportamentos nos três níveis analisados. Considerando que as linhas a vermelho representam áreas de acrilamida superiores enquanto as azuis áreas de acrilamida menores, a 40°C a variável tempo de extração (t) é mais expressiva, observável através da horizontalidade das linhas que representam a mesma área. No nível correspondente a 60°C, a verticalidade observada torna a variável rácio (r) mais expressiva, enquanto a 50°C o comportamento é intermédio. Da comparação entre estes observa-se que a 60°C com a mesma quantidade de propanol, por exemplo 1.5 (20 mL), mesmo que o tempo de exposição seja o mínimo obtêm-se áreas superiores do que a 40°C, provando a influência positiva da temperatura. Tanto a duas dimensões (figura 30 – 1a, 2a e 3a) como a três dimensões (figura 30 – 1b, 2b e 3b), as áreas mais elevadas foram atingidas no ponto (1,1), isto é, com a maior quantidade de propanol (30 mL) e com o maior tempo com a fibra exposta, a 60°C.

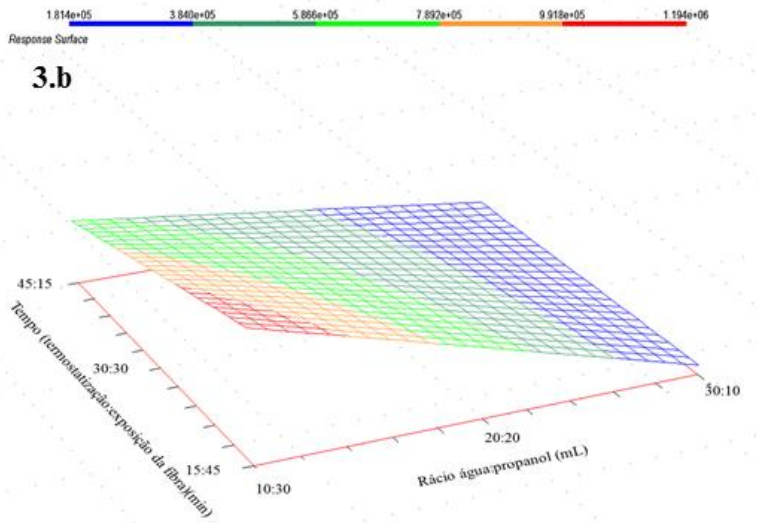
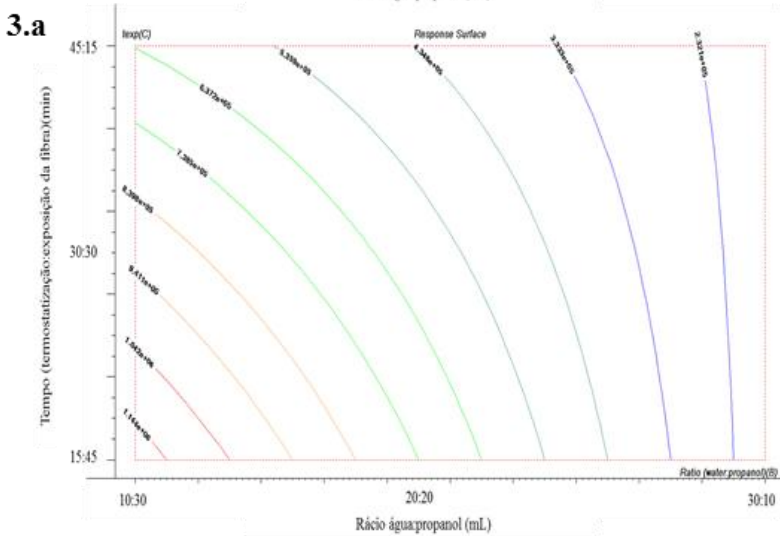
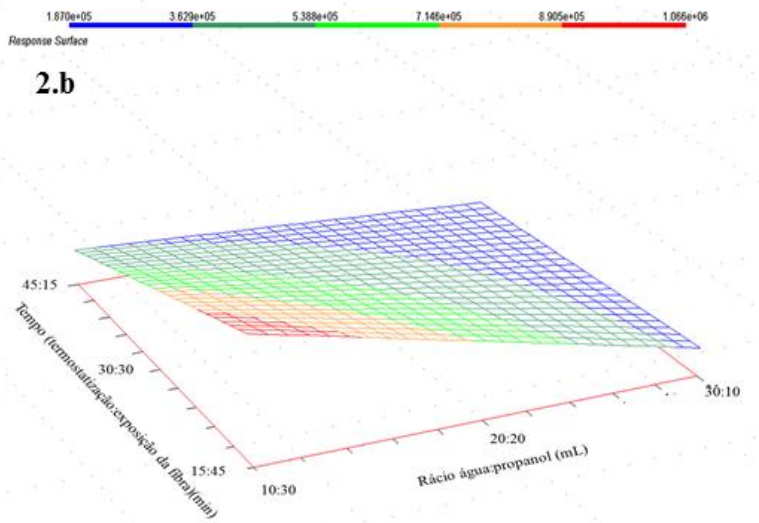
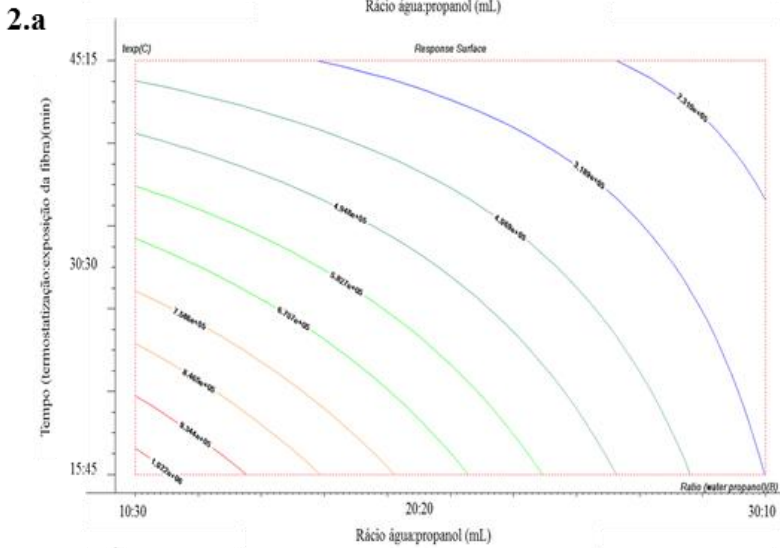
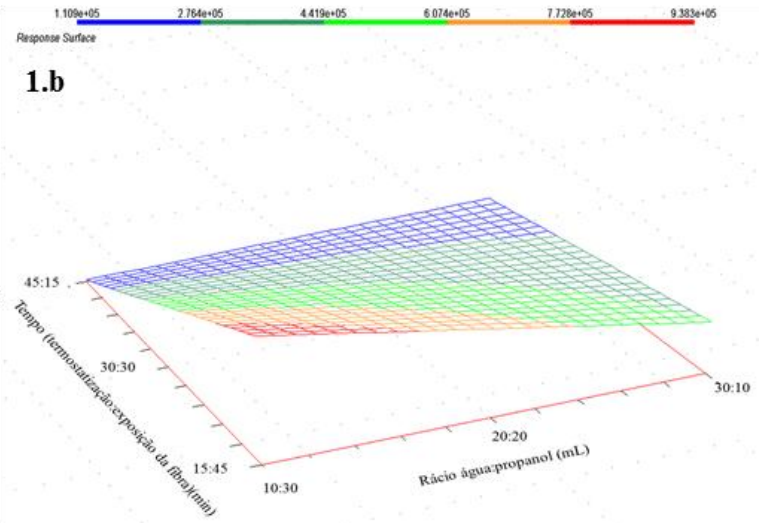
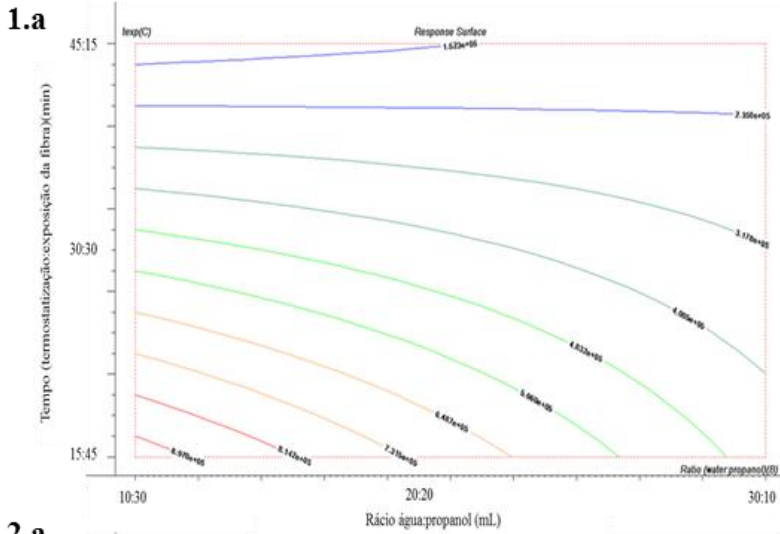


Figura 30 - Representação gráfica bidimensional (a) e tridimensional (b) do tempo de exposição e rácio água:propanol em função da área de acrilamida obtida a 40 (1), a 50 (2) e a 60 °C (3).

Nos gráficos da figura 30 é possível observar que há uma tendência para uma subida das áreas no sentido do aumento tanto do tempo de exposição da fibra como da quantidade de propanol, não se tendo atingido o ponto no qual, teoricamente, a área obtida seria máxima. Essa condição, com maior quantidade de propanol e mais tempo de termostatização, seria interessante mas encontrava-se fora dos limites práticos impostos para cada condição: maior quantidade de propanol (mais que 30 mL) implicaria um volume de água inferior a 10 mL (para a manutenção dos 40 mL totais e por conseguinte da razão volume amostra:volume do espaço de cabeça) o que não era desejável devido ao facto de que a extração da acrilamida da amostra para a água era necessária antes da passagem para o propanol; maior tempo de exposição da fibra iria favorecer logicamente uma maior extração, pois o sistema tende para o equilíbrio entre as diferentes fases e este poderia nunca ser atingido, mas tendo sido estabelecido um limite de 60 min de duração total, um tempo superior de exposição da fibra implicaria uma diminuição do tempo de termostatização o que não é desejável, pois este é indispensável para o controlo da temperatura no interior do frasco que é necessária que seja constante, a par dos outros fatores como a agitação, a fim de diminuir as variações entre ensaios. A condição escolhida para as análises posteriores foi, por isso, 60°C, 10 mL de água para 30 mL de propanol e 15 min de termostatização com 45 min de exposição da fibra.

Estes resultados eram os esperados no que diz respeito ao rácio (água: propanol) e ao tempo de exposição da fibra mas não quanto à temperatura. A passagem de compostos para o espaço de cabeça é diretamente influenciada pela temperatura (70), pelo que o esperado seria que esta fosse um fator estatisticamente significativo. Poder-se-ia assistir a um efeito significativo na temperatura se fosse testado um intervalo mais alargado, o que não aconteceu devido às limitações inicialmente impostas (secção 3.3.2.1). Seria de esperar um aumento de acrilamida extraída com a quantidade de propanol pois este vai diminuir a solubilidade da acrilamida e, sendo esta um composto semi-volátil, facilitaria a sua passagem para o espaço de cabeça. Por fim, o facto de o maior o tempo de exposição da fibra ter uma significância elevada era também esperado, pois o tempo em que a fibra estava exposta ao espaço de cabeça é logicamente um fator determinante para a extração.

### 4.2.3 Seleção da quantidade de bolacha a usar

A quantidade de bolacha a usar para a quantificação de acrilamida em bolachas utilizando este método foi selecionada após a realização de ensaios com três massas diferentes com adição de solução padrão de acrilamida. A adição de padrão tem como objetivo observar o efeito da matriz. Quanto maior a quantidade de bolacha inserida no frasco maior a quantidade de acrilamida presente. No entanto, quantidades elevadas de massa podem tornar-se prejudiciais à extração, na medida em que a solução com bolacha em quantidades elevadas desta, solidifica acabando por reter a acrilamida e impedindo que esta passe para o espaço de cabeça e seja extraída pela fibra (nesta fase a rotação do magnete é comprometida). Assim, o valor a usar de massa de bolacha surge como compromisso entre estes dois fatores. Os resultados apresentados na figura 31, onde estão representadas as áreas de acrilamida para as diferentes quantidades de bolacha testadas (1, 2, e 3 g de bolacha), mostram um valor superior de acrilamida extraída e identificada quando utilizando 1 g de bolacha. Por esta razão optou-se por usar 1 g de bolacha de aveia nos restantes estudos incluindo esta amostra.

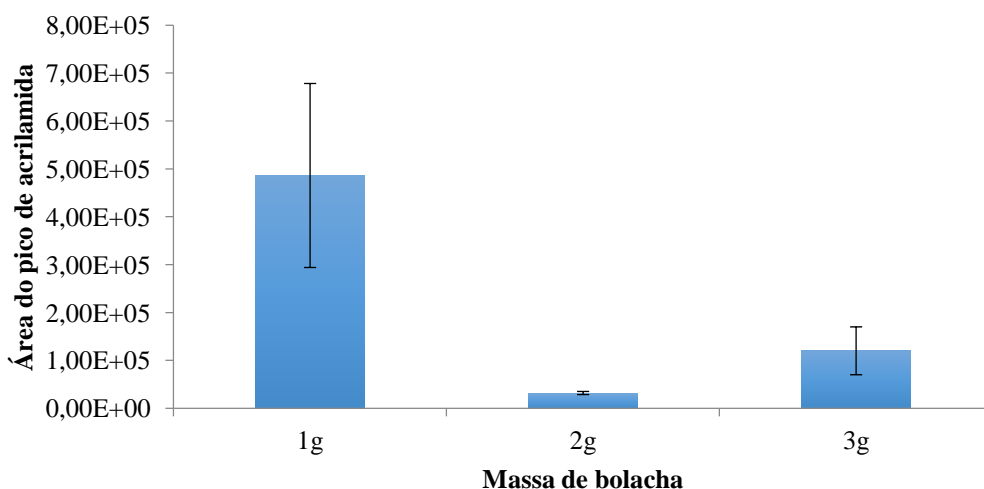


Figura 31 - Área dos picos de acrilamida em função da massa de bolacha inserida no frasco.

### **4.3 HS-SPME-GC-MS**

A utilização de um detetor MS apresenta menores limites de detecção (mais sensível) do que o FID (90). Este último é, segundo a literatura, mais robusto e apresenta menor variação, ou seja, melhor reprodutibilidade, sendo por isso útil para uma visão inicial da composição da amostra e das proporções entre compostos (90). No entanto, o detetor MS oferece informação estrutural de cada composto e mais sensibilidade (76, 87). Tendo esta parte do trabalho como objetivo a obtenção de limites de detecção e quantificação de concentrações baixas de acrilamida, esta decorreu utilizando um GC-MS.

#### **4.3.1 Calibração externa do método**

A concentração de acrilamida da figura 32 encontra-se expressa em relação à área do pico de acrilamida. No intervalo de concentrações examinado, foram calculados o limite de detecção (LoD) e o limite de quantificação (LoQ), sendo para a acrilamida 0,611 µg/frasco e 2,037 µg/frasco, respetivamente. Tendo sido introduzida 1 g de amostra no volume de 40 mL de solução em cada frasco de extração os limites de detecção e quantificação podem ser representados como 0,611 mg/kg e 2,037 mg/kg.

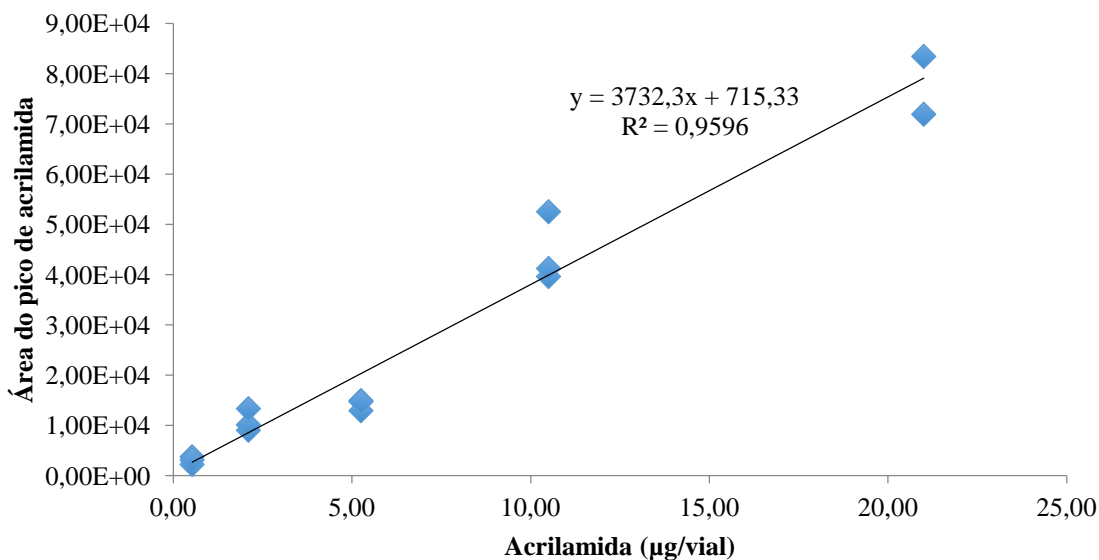


Figura 32 - Curva de calibração externa de acrilamida.

Na maioria dos métodos apresentados na literatura, a determinação e quantificação da acrilamida em alimentos requer diversos passos de tratamento da amostra, tais como, extrações sólido-líquido e líquido-líquido, conjugados com diversos passos de limpeza e purificação previamente à análise, tornando-se estes métodos morosos e complexos, principalmente para aplicação em análises de rotina. O método apresentado neste trabalho, quando comparado com outros métodos de extração e quantificação de acrilamida em alimentos descritos na literatura (45–48), apresenta valores de LoQ e LoD que podem ser considerados elevados. No entanto, demonstrou-se ser um método rápido e simples de implementar, quantificando a acrilamida diretamente no espaço de cabeça do frasco contendo a bolacha dispersa em soluções aquosas (extração em um só passo). Tendo em conta o valor máximo recomendado para bolachas de 0,5 mg/kg segundo a EFSA (26), esta metodologia pode ser aplicada como uma ferramenta de controlo em análises de rotina, onde valores superiores a 0,5 mg/kg, passíveis de serem detetados, devem ser tidos em consideração.

Por forma a conseguir diminuir os valores de LoD e LoQ para aplicação em análises mais exigentes, por exemplo em bolachas para crianças (idade <3anos) onde o valor limite recomendado é de 0,2 mg/kg (91), propõe-se no futuro a utilização de um equipamento com maior sensibilidade de deteção.

### 4.3.2 Influência do rácio água:propanol na análise

Após a otimização das condições de deteção da acrilamida em HS-SPME GC-FID utilizando uma concentração de 5 mg/frasco (secção 4.2.2), foram testadas concentrações mais reduzidas (2,1, 10,5 e 21,0 µg/frasco) utilizando HS-SPME/GC-MS por forma a aproximar as concentrações existentes em bolachas (figura 33). Foram também testadas diferentes proporções de água: propanol nomeadamente: 40:0, 30:10, 20:20, 10:30 e 0:40 (mL:mL), mantendo as restantes condições como temperatura (60 °C) e tempo de termostatização/exposição (15:45 min:min) constantes, com o objetivo de estudar a influência do rácio água: propanol na extração da acrilamida para concentrações mais baixas.

Na figura 33 observa-se que a utilização de uma razão água: propanol é estritamente necessária para a deteção e quantificação da acrilamida. A utilização de apenas água ou propanol tem um efeito similar obtendo-se áreas cromatográficas que não ultrapassam  $1,5 \times 10^4$ . Com a utilização de rácios água: propanol (crescentes na proporção de propanol), as áreas aumentam até 5 vezes mais, confirmando a tendência já observada aquando da otimização deste parâmetro utilizando concentrações mais elevadas (secção 4.2.2).

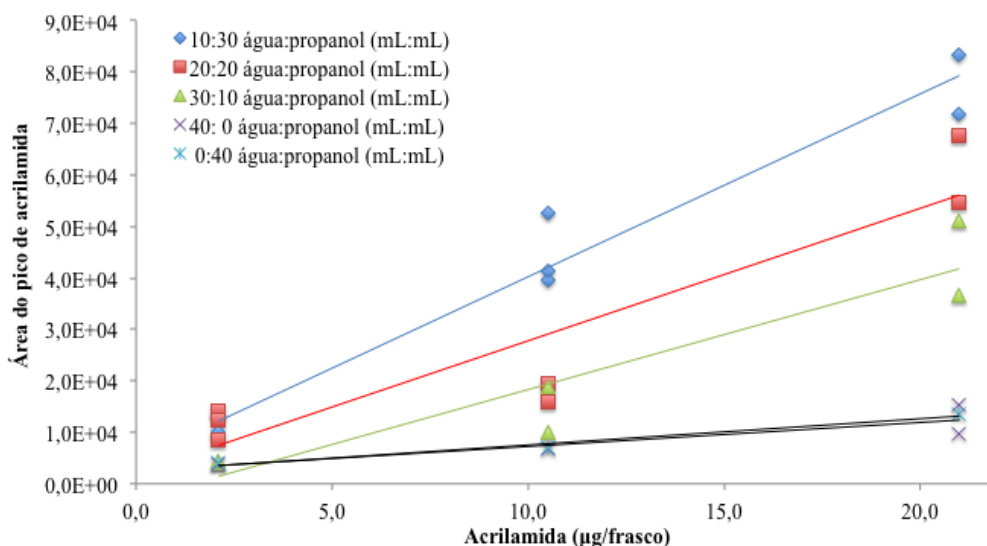


Figura 33 – Área cromatográfica da acrilamida em função de diferentes rácios de água:propanol, nomeadamente: 40:0 (roxo), 30:10 (verde), 20:20 (vermelho), 10:30 (azul escuro) e 0:40 (azul claro) (mL:mL).

### 4.3.3 Influência do tempo de extração

O tempo de exposição utilizado na otimização das condições de extração por HS-SPME variou entre 15 e 45 min, valores que são normalmente balizados para uma extração de HS-SPME. No entanto, sabendo que esta variável pode ter uma influência significativa na quantidade de acrilamida extraída, foram testadas condições de tempo mais prolongadas por forma a prever a tendência máxima da área do pico de acrilamida. Na figura 34 está representado o comportamento obtido quando a fibra é deixada a extrair durante 45 min ou 4, 14 e 38 h para uma solução de 10,5 µg/frasco. Observa-se que o equilíbrio é atingido por volta das 4 h, não se verificando um aumento significativo na área da acrilamida para valores de tempo superiores. Mais ainda, observou-se que durante 4 h de exposição houve um aumento de 62% da área do pico de acrilamida em relação à área obtida com uma extração de 45 min. Este aumento é positivo, no entanto tendo em vista uma utilização deste método em análises de rotina, uma extração durante 4 h será pouco viável.

O perfil observado na figura 34 é comparável ao observado em outros estudos na extração de analitos por HS-SPME (74). Observa-se uma ligeira diminuição da área do pico de acrilamida no ponto obtido com 38 h de extração quando comparado com as áreas obtidas com 4 e 14 h de extração, que se justifica por uma diminuição da temperatura no espaço de cabeça, condicionada pela evaporação da água no banho de imersão, uma limitação não controlada e associada ao longo tempo de exposição da fibra.



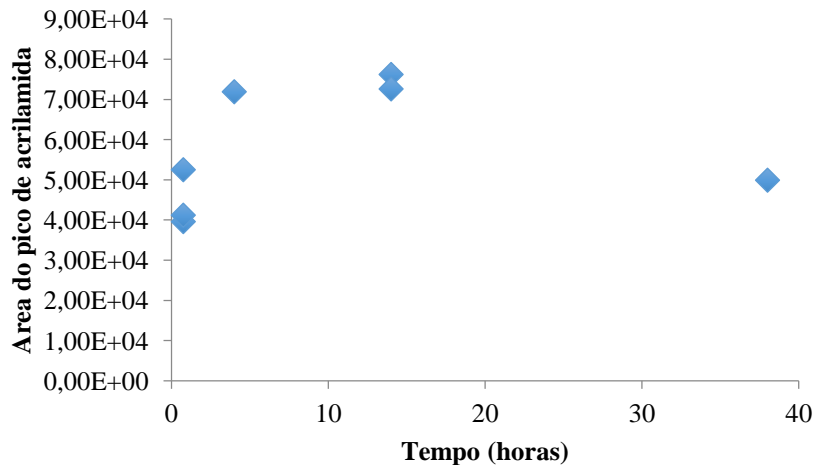


Figura 34 - Variação da área cromatográfica do pico de acrilamida ao longo do tempo com adição de solução padrão de acrilamida (10,5 µg/frasco).

#### 4.3.4 Amostra de bolacha de aveia

Selecionadas as condições experimentais para a aplicação do método de extração por HS-SPME, procedeu-se à aplicação deste a uma amostra real – bolacha de aveia. As bolachas de aveia são, atualmente, alimentos de consumo elevado, motivado pelo alto valor nutricional, nomeadamente em fibras (92) e proteínas (93). Num estudo recente Ciesarová et al. (94), mostram que a crosta de pão confeccionado com farinha de aveia apresenta valores mais elevados de acrilamida do que os apresentados na confeção utilizando farinha de trigo. Este teor mais elevado deve-se à maior disponibilidade do aminoácido precursor da acrilamida, a L-asparagina, na farinha de aveia. Pelo mesmo motivo, prevê-se que também as bolachas confeccionadas com farinha de aveia apresentem maior quantidade de acrilamida.

Na figura 35 encontra-se representada a reta de calibração ( $R^2=0,94$ ) para a acrilamida obtida utilizando o método de adição de padrão (diferentes concentrações de acrilamida) para 1 g de bolacha de aveia. Utilizando a equação da regressão linear ( $y=2344,5x + 4804,3$ ) calculam-se que existiam 2,049 µg de acrilamida por frasco, isto é, 2,049 mg/kg de bolacha. Este valor é superior ao recomendado pela EFSA (0,5 mg/kg de bolacha), mas dentro dos valores reportados na literatura para bolachas (Tabela 2, secção 1.1.4) (3). Na figura 36 está

representado como exemplo um dos cromatogramas obtidos decorrentes da extração de acrilamida em amostras reais, nomeadamente em bolachas de aveia.

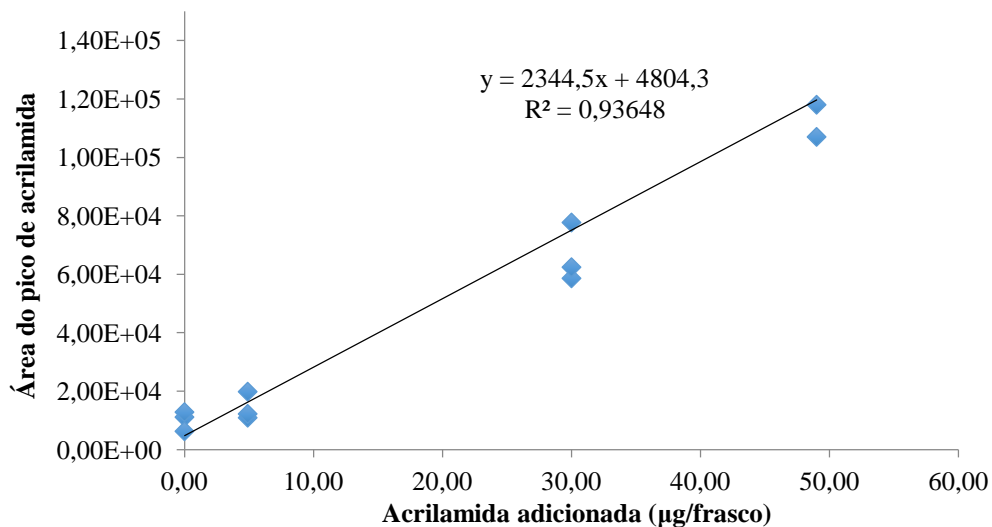


Figura 35 - Curva de calibração interna da amostra de bolacha de aveia, utilizando o método de adição de padrão.

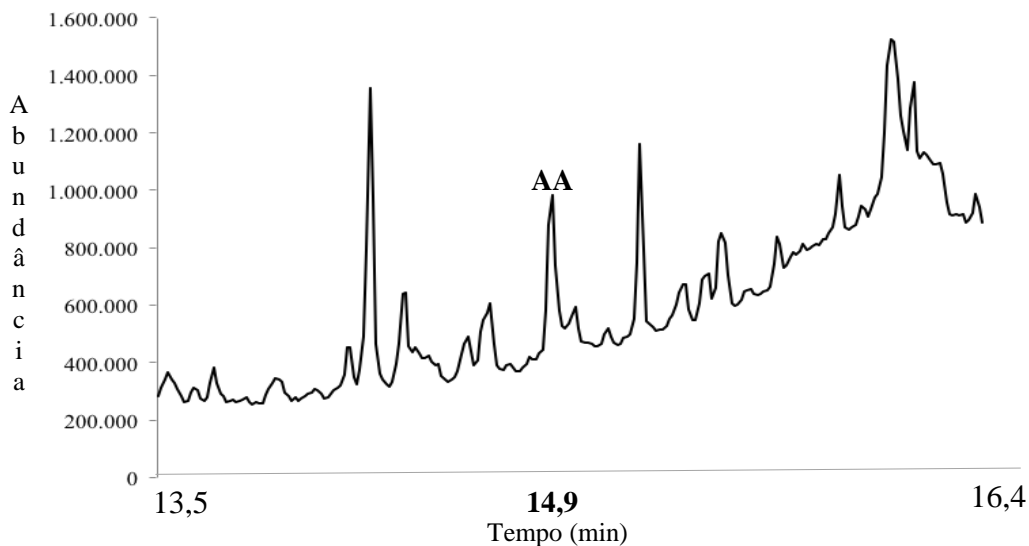


Figura 36 – Fração do cromatograma (com extração de ião a  $m/z$  71) obtido com 1 g de bolacha de aveia, com o pico de acrilamida (AA) a eluir aos 14,97 min.

#### 4.3.5 Batata frita

Utilizando respectivamente 1 e 4 g de batata, com adição de padrão (105 µg/frasco), aplicaram-se as condições de extração por HS-SPME anteriormente otimizadas, cujos resultados estão representados na figura 37a. Verifica-se que a presença desta matriz prejudica a extração da acrilamida para o espaço de cabeça, obtendo-se valores inferiores ao próprio padrão na presença desta. Este efeito prevê-se tanto maior quanto maior for a quantidade de batata adicionada, revelando assim um efeito de matriz.

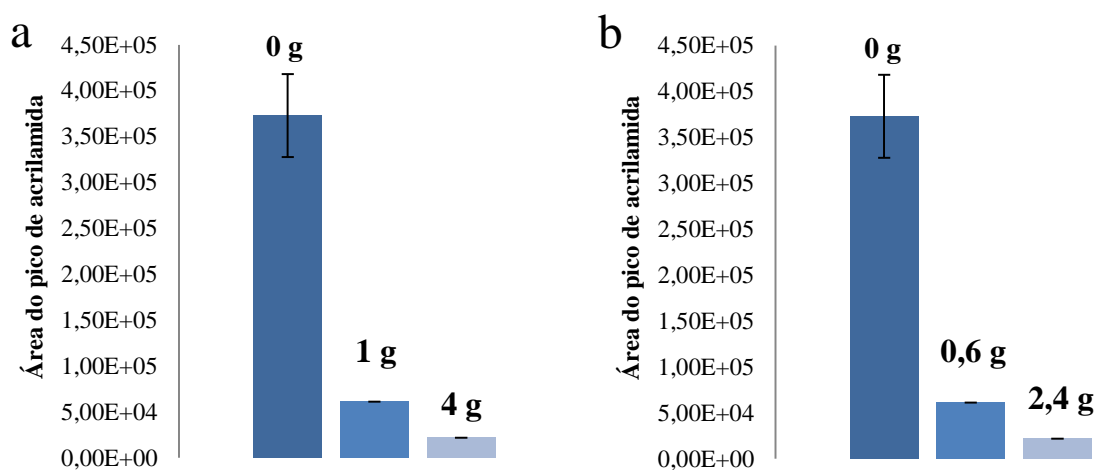


Figura 37 - Comparação das áreas de acrilamida obtidas com adição de 105 µg/frasco: a) 0, 1 e 4 g de batata frita; b) 0, 0,6 e 2,4 g de óleo vegetal (soluções modelo utilizando a quantidade de óleo (60%) existente na batata).

Pela quantidade elevada de óleo existente nesta matriz ( $\approx 60\%$ ), propôs-se verificar o seu efeito na extração utilizando condições modelo (figura 37b). Assim, foram realizados ensaios em que a batata foi substituída por 60% da sua massa em óleo vegetal, obtendo-se os resultados apresentados na figura 37b. Verificou-se que o óleo vegetal contribui para uma diminuição de cerca de 81% e 72% da área do pico de acrilamida em relação ao padrão para 2,4 g e 0,6 g, respectivamente. Os resultados mostram que a presença do óleo vegetal, tal como já tinha sido reportado quando utilizando a batata (figura 37a), diminuiu na mesma proporção o valor da área de acrilamida (figura 37b). Esta diminuição deve-se possivelmente à retenção da acrilamida no óleo, impedindo que a acrilamida passe para o espaço de cabeça. Este efeito de retenção da acrilamida em óleo foi já reportado na literatura para diminuir as perdas de

acrilamida aquando da sua evaporação com solventes orgânicos (95). Apesar de ter havido uma descida, os valores obtidos com óleo são ligeiramente superiores aos obtidos com batata, o que seria de esperar visto que, no caso da batata, para além da gordura ainda existe a matriz sólida. Por fim, por comparação entre os valores de óleo (0,6 e 2,4 g) assiste-se que com maior quantidade de óleo, menor quantidade acrilamida é extraído, podendo esta ficar retida no óleo.

#### **4.3.6 Bolacha de trigo “Maria”**

As bolachas confeccionadas com farinha de trigo e sacarose são as mais comuns no mercado e também das que possuem valores mais baixos de acrilamida quando comparadas com as bolachas confeccionadas, por exemplo, com farinha de aveia ou adição de frutose (21, 91). Na figura 38 estão apresentadas as retas correspondentes aos resultados obtidos para as duas bolachas comerciais testadas pelo método de adição padrão, nomeadamente bolachas confeccionadas com farinha de trigo e de aveia. Observa-se que as duas retas possuem um declive diferente, não sendo paralelas, e mostrando assim uma influência diferente da matriz da bolacha de trigo “Maria” em relação ao efeito matriz da bolacha de aveia. A presença de uma efeito de matriz diferente entre as amostras testadas, tal como se observa na figura 38, não permite construir uma curva de calibração para quantificação externa da acrilamida em diferentes tipos de bolacha, sem a de necessidade efetuar uma curva de calibração para cada amostra. O valor de acrilamida nas bolachas de trigo estava muito abaixo do valor quantificado para as bolachas de aveia, mesmo estando abaixo do limite de deteção, LoD (<0,611 mg/kg), o que está de acordo com a literatura (94).

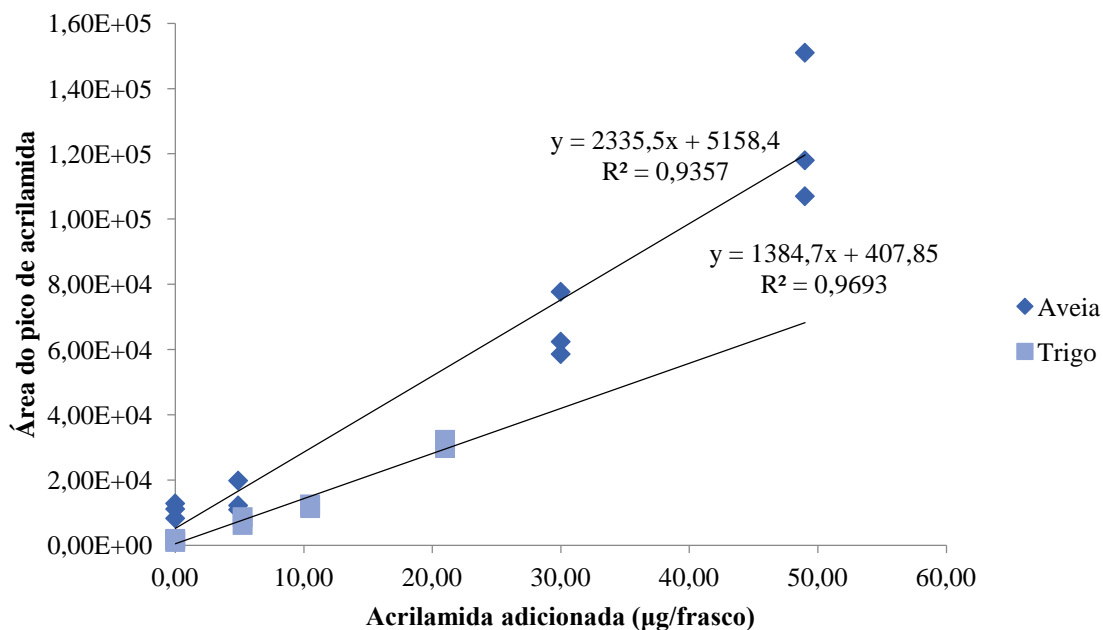


Figura 38 – Curva de calibração com bolacha de aveia (losangos) e bolacha de trigo “Maria” (quadrados).

Na Tabela 11 está apresentada a informação nutricional das duas bolachas, onde é possível observar as semelhanças e diferenças na composição. A principal diferença entre as duas bolachas está na quantidade de lípidos, respetivamente de 16,6 g/100g na bolacha de aveia e 9,0 g/100g na bolacha de trigo, ou seja, cerca de 45,8% mais de lípidos na bolacha de aveia em relação à bolacha de trigo. No estudo efetuado anteriormente com batata frita e óleo vegetal foi mostrado um efeito negativo da gordura na extração e/ou passagem da acrilamida para o espaço de cabeça. Seria de esperar por isso, um efeito negativo na resposta da bolacha de aveia (maior concentração de lípidos), logo um declive inferior ao observado para a bolacha de trigo. Na figura 38, observa-se exatamente o contrário: a bolacha de aveia apresenta um declive superior ao observado para a bolacha de trigo. Uma explicação possível para este efeito é o facto da bolacha de aveia, para além de maior teor lipídico, apresentar também, maior quantidade de fibras (Tabela 11): 4,3g/100g (bolacha de aveia) para 2,9g/100g (bolacha de trigo), uma diferença de 32,6%. A explicação para este efeito reside na capacidade de retenção de gorduras associada à presença de fibras alimentares na matriz (96). Espera-se por isso, que a presença de uma proporção superior de fibras nas bolachas de aveia supere o efeito da presença de maior quantidade de lípidos, permitindo a passagem de maior

quantidade de acrilamida para o espaço de cabeça, logo um efeito de aumento no declive da reta de adição padrão associado à bolacha de aveia (figura 38). Seria importante no futuro estudar o efeito da adição de fibras, tal como foi feito o estudo para o efeito da presença de lípidos (secção 4.3.5) para confirmação destas hipóteses.

Tabela 11 – Informação nutricional da bolacha de aveia e da bolacha de trigo “Maria” fornecidas pelo produtor no rótulo do produto (Vieira de Castro – Produtos alimentares SA).

<b>Informação nutricional</b>	<b>Bolacha de Aveia (por 100 g)</b>	<b>Bolacha de trigo “Maria” (por 100 g)</b>
<b>Valor energético</b>	2004 kJ/477 kcal	1794 kJ/425 kcal
<b>Proteínas</b>	7,6 g	8,3 g
<b>Hidratos de carbono</b>	72,1 g	76,3 g
<b>Açúcares</b>	24,3 g	19,8 g
<b>Lípidos</b>	<b>16,6 g</b>	<b>9,0 g</b>
<b>Saturados</b>	8,1 g	4,3 g
<b>Fibras Alimentares</b>	<b>4,3 g</b>	<b>2,9 g</b>
<b>Sódio</b>	0,64 g	0,46 g
<b>Sal</b>	1,6 g	1,2 g



## 5. Conclusões e trabalho futuro

Ao longo deste trabalho, centrado na molécula acrilamida, foram apresentadas novas estratégias de mitigação de acrilamida em bolachas e desenvolvido um método de detecção e quantificação desta também em bolachas.

No âmbito das estratégias de mitigação, a partir dos extratos testados neste trabalho é possível concluir que a adição de extratos de café (0,1% e 0,5%) não provoca alterações no teor de acrilamida mas assiste-se a uma influência na cor dos modelos de bolachas. A utilização conjugada de uma mistura de extratos de café com ácido tartárico, revelou uma influência positiva levando à diminuição da concentração de acrilamida em 81,7%, não tendo sido no entanto suficiente para uma alteração adequada na cor dos modelos testados. A adição de pectina comercial (5%) diminuiu efetivamente a quantidade de acrilamida em bolachas de frutose para níveis idênticos aos quantificados com modelos de sacarose, provando um efeito de mitigação. Pela desesterificação da pectina é possível prever uma redução das quantidades com efeito de mitigação a utilizar numa futura aplicação industrial.

O desenvolvimento e estudo do método de extração da acrilamida de bolachas por HS-SPME consistiu na seleção do tipo de fibra de SPME e na otimização das condições de extração por aplicação de ferramentas estatísticas. A fibra com melhores resultados foi a fibra CAR-PDMS. Por conjugação de respostas de superfície com a aplicação de um desenho experimental do tipo Box-Behnken as condições ótimas obtidas foram: 60°C, 10:30 (mL:mL) água:propanol e 15 min de termostatização com 45 min de exposição da fibra. Para a sustentação do método foram determinados os limites de detecção (LoD) e de quantificação (LoQ) em modelos por HS-SPME/GC-qMS, com posterior aplicação deste método em duas amostras de bolacha reais (aveia e trigo). Os valores de LoD e LoQ obtidos foram 611 µg/kg e 2037 µg/kg, respetivamente. A concentração de acrilamida na bolacha de aveia foi quantificada pelo método de adição de padrão em 2049 µg/kg. Já na bolacha de trigo, os valores de acrilamida obtidos foram inferiores ao limite de detecção. Com a aplicação deste método numa amostra de batata frita foi possível observar uma influência negativa na detecção/quantificação da acrilamida devido à presença de elevadas quantidade de lípidos. No



entanto, o estudo comparativo entre bolachas de aveia e trigo revelou que a ação negativa da componente lipídica poderá ser minimizada pela presença de fibras alimentares. Tal hipótese poderá ser avaliada futuramente em soluções modelo e por aplicação em outras matrizes.

Em grande parte dos métodos apresentados na literatura, a determinação e quantificação da acrilamida em alimentos requer diversos passos de tratamento da amostra, tornando-se estes métodos morosos e complexos, nomeadamente na sua aplicação em análises de rotina. O método apresentado neste trabalho, quando comparado com outros métodos de extração e quantificação de acrilamida em alimentos, apresenta valores de LoQ e LoD que podem ser considerados elevados. No entanto, demonstrou-se ser um método mais rápido e simples de implementar, quantificando a acrilamida diretamente no espaço de cabeça do frasco contendo a bolacha dispersa em soluções aquosas (extração num só passo). Tendo em conta o valor máximo recomendado para bolachas de 0,5 mg/kg segundo a EFSA, esta metodologia pode ser aplicada como uma ferramenta de controlo em análises de rotina, onde valores superiores a 0,5 mg/kg, passíveis de serem detetados, devem ser tidos em consideração.

Por forma a conseguir diminuir os valores de LoD e LoQ para aplicação em análises mais exigentes, como é o exemplo de bolachas para crianças (idade <3anos) onde o valor limite recomendado é de 0,2 mg/kg, propõe-se no futuro a utilização de um equipamento com maior sensibilidade de deteção tal como o GCxGC-ToF/MS.

## 6. Referências Bibliográficas

1. McCollister D, Oyen F, Rowe V. *Toxicology of acrylamide*, Toxicol Appl Pharmacol., 1964, vol.6, pp.172–181
2. Friedman M. *Chemistry, Biochemistry, and safety of acrylamide. A review*. J Agric Food Chem., 2003, vol. 51, pp.4504–4526.
3. Capuano E, Fogliano V. *Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies*. LWT - Food Sci Technol., 2011 , vol. 44, pp.793–810.
4. Blank I. *Current status of acrylamide research in food: measurement, safety assessment, and formation*. Ann N Y Acad Sci., 2005, vol. 1043, pp. 30–40.
5. Rosén J, Hellenäs K-E. *Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Analyst., 2002, vol.127, pp.880–882.
6. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. *Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs*. J Agric Food Chem., 2002, vol. 50, pp. 4998–5006.
7. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. *Acrylamide is formed in the Maillard reaction*. Nature, 2002, vol. 419, pp. 448–449.
8. Yaylayan V, Wnorowski A, Perez Locas C. *Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide*. J Agric Food Chem., 2003, vol. 51, pp. 1753–1757.
9. Amrein TM, Andres L, Escher F, Amadò R. *Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options*. Food Addit Contam., 2007, vol. 24, pp. 13–25.
10. Zyzak D V, Sanders R a, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK. *Acrylamide formation mechanism in heated foods*. J Agric Food Chem., 2003, vol. 51, pp. 4782–4787.
11. Granvogl M, Schieberle P. *Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide*. J Agric Food Chem., 2006, vol. 54. pp. 5933–5938.
12. Becalski A, Lau BP-Y, Lewis D, Seaman SW. *Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling*. J Agric Food Chem., 2003, vol. 51, pp. 802–808.
13. Yasuhara A, Tanaka Y, Hengel M, Shibamoto T. *Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems*. J Agric Food Chem., 2003, vol 51, pp. 3999–4003.
14. Zhang Y, Zhang G, Zhang Y. *Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods*. J Chromatogr A., 2005, vol.1075, pp.1–21.

15. Ehling S, Hengel M, Shibamoto T. *Formation of acrylamide from lipids*. Chemistry and Safety of Acrylamide in Food., 2005, p. 223–233.
16. Vattem D, Shetty K. *Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction*. Innov Food Sci Emerg Technol., 2003, vol. 4, pp. 331–338.
17. Gertz C, Klostermann S. *Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products*. Eur J Lipid Sci Technol., 2002, vol. 104, pp. 762–771.
18. Claeys WL, De Vleeschouwer K, Hendrickx ME. *Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide*. Trends Food Sci Technol., 2005, vol. 16, pp. 181–193.
19. Rydberg P, Eriksson S, Tareke E, Karlsson P, Ehreenberg L, Tornqvist M. *Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs*. J Agric Food Chem., 2003, vol. 51, pp. 7012–7018.
20. Gökmen V, Açar ÖÇ, Köksel H, Acar J. *Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies*. Food Chem., 2007, vol. 104, pp. 1136–1142.
21. Surdyk N, Rosén J. *Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread*. J Agric Food Chem., 2004, vol. 52, pp. 2047–2051.
22. Zhang Y, Zhang Y. *Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge*. Crit Rev Food Sci Nutr., 2007, vol. 47, pp. 521–542.
23. Delatour T, Périsset A. *Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass*. J Agric Food Chem., 2004, vol. 52, pp. 4625–4631.
24. Xu Y, Cui B, Ran R, Liu Y, Chen H, Kai G. *Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: current status and future prospects*. Food Chem Toxicol., 2014, vol. 69, pp. 1–12.
25. Bergmark E. *Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers*. Chem Res Toxicol., 1997, vol. 10, pp. 78–84
26. EFSA. *Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010*. 2012, vol. 10, pp. 1–38.
27. Pedreschi F, Mariotti MS, Granby K. *Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment*. J Sci Food Agric., 2014, vol. 94, pp. 9–20.
28. Freisling H, Moskal A, Ferrari P, Nicolas G, Knaze V, Clavel-Chapelon F. *Dietary acrylamide intake of adults in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition differs greatly according to geographical region*. Eur J Nutr., 2013, vol. 52, pp. 1369–1380.
29. Boon PE, de Mul A, van der Voet H, van Donkersgoed G, Brette M, van Klaveren JD. *Calculations of dietary exposure to acrylamide*. Mutat Res., 2005, vol. 580, pp. 143–155.

30. Ma Y, Shi J, Zheng M, Liu J, Tian S, He X. *Toxicological effects of acrylamide on the reproductive system of weaning male rats*. *Toxicol Ind Health.*, 2011, vol. 27, pp. 617–627.
31. Tyl R, Friedman M. *Effects of acrylamide on rodent reproductive performance*. *Reprod Toxicol.*, 2003, vol. 17, pp. 1–13.
32. Ghanayem BI, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennell TR. *Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts*. *Toxicol Sci.*, 2005, vol. 88, pp. 311–318.
33. Rommens C, Ye J. *Improving potato storage and processing characteristics through all-native DNA transformation*. *J Agric Food Chem.*, 2006, vol. 54, pp. 9882–9887.
34. Capuano E, Ferrigno A, Acampa I, Serpen A, Ozge Ç. A, Gokmen V, et al. *Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies*. *Food Res Int.*, 2009, vol. 42, pp.1295–1302.
35. Tareke E, Rydberg P. *Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs*. *J Agric Food Chem.*, 2002, vol. 51, pp. 4998–5006.
36. Low M, Koutsidis G. *Effect of citric acid and glycine addition on acrylamide and flavor in a potato model system*. *J Agric Food Chem.*, 2006, vol. 54, pp. 5976–5983.
37. Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D. *Efectos sobre la presión arterial de la restricción dietética del sodio y dieta del Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Study*. *Clínica e Investig en Arterioscler.*, 2001, vol. 13, pp. 282–283.
38. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed., 2004, pp. 396.
39. Keramat J, LeBail A, Prost C, Soltanizadeh N. *Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review*. *Food Bioprocess Technol.*, 2010, vol. 4, pp. 340–363.
40. Hennion M-C. *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. *J Chromatogr A.*, 1999, vol. 856, pp. 3–54.
41. Wenzl T, De La Calle MB, Anklam E. *Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review*. *Food Addit Contam.*, 2003, vol. 20, pp. 885–902.
42. Dunovská L, Cajka T, Hajslová J, Holadová K. *Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry*. *Anal Chim Acta.*, 2006, vol. 578, pp. 234–240.
43. Zhang Y, Dong Y, Ren Y, Zhang Y. *Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector*. *J Chromatogr A.*, 2006, vol. 1116, pp. 209–216.
44. Zhu Y, Li G, Duan Y, Chen S, Zhang C, Li Y. *Application of the standard addition method for the determination of acrylamide in heat-processed starchy foods by gas chromatography with electron capture detector*. *Food Chem.*, 2008, vol. 109, pp. 899–908.

45. Wenzl T, Karasek L, Rosen J, Hellenæs K-E, Crews C, Castle L. *Collaborative trial validation study of two methods, one based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and on gas chromatography-mass spectrometry for the determination of acrylamide in bakery and potato products.* J Chromatogr A., 2006, vol. 1132, pp. 211–218.
46. Serpen A, Gökmen V. *Modeling of acrylamide formation and browning ratio in potato chips by artificial neural network.* Mol Nutr Food Res. 2007, vol. 51, pp. 383–389.
47. Fernandes JO, Soares C. *Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of acrylamide in potato chips.* J Chromatogr A., 2007, vol. 1175, pp. 1–6.
48. Pittet A, Périsset A, Oberson J-M. *Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography–mass spectrometry.* J Chromatogr A., 2004, vol. 1035, pp.123–130.
49. Lagalante A, Felter M. *Silylation of acrylamide for analysis by solid-phase microextraction/gas chromatography/ion-trap mass spectrometry.* J Agric Food Chem., 2004, vol. 52, pp. 3744–3748.
50. Lee M-R, Chang L-Y, Dou J. *Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-positive chemical ionization tandem mass spectrometry.* Anal Chim Acta., 2007, vol. 582, pp. 19–23.
51. Hoenicke K, Gatermann R, Harder W, Hartig L. *Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry.* Anal Chim Acta. 2004, vol. 520, pp. 207–215.
52. Wang H, Lee AWM, Shuang S, Choi MMF. *SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods.* Microchem J., 2008, vol. 89, pp. 90–97.
53. Paleologos EK, Kontominas MG. *Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection.* J Chromatogr A., 2005, vol. 1077, pp. 128–35.
54. Gökmen V, Şenyuva HZ, Acar J, Sarioğlu K. *Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography.* J Chromatogr A., 2005, vol. 1088, pp. 193–199.
55. Geng Z, Jiang R, Chen M. *Determination of acrylamide in starch-based foods by ion-exclusion liquid chromatography.* J Food Compos Anal., 2008, vol. 21, pp. 178–82.
56. Kaplan O, Kaya G, Ozcan C, Ince M, Yaman M. *Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry.* Microchem J., vol. 93, pp. 173–179.
57. Rufián-Henares J, Morales F. *Determination of acrylamide in potato chips by a reversed-phase LC–MS method based on a stable isotope dilution assay.* Food Chem., 2006, vol. 97, pp. 555–562.

58. Gökmen V, Senyuva HZ. *A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods*. J Chromatogr A., 2006, vol.1120, pp. 194–198.
59. Zhang Y, Jiao J, Ren Y, Wu X, Zhang Y. *Determination of acrylamide in infant cereal-based foods by isotope dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta., 2005, vol. 551, pp. 150–158.
60. Nielsen NJ, Granby K, Hedegaard R V., Skibsted LH. *A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread*. Anal Chim Acta., 2006, vol. 557, pp. 211–220.
61. Bermudo E, Moyano E, Puignou L, Galceran MT. *Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure*. Anal Chim Acta., 2006, vol. 559, pp. 207–214.
62. Armbruster DA, Pry T. *Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation*. Clin Biochem Rev., 2008, vol. 29, pp. 49–52.
63. Zhang Y, Ren Y, Zhao H, Zhang Y. *Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta., 2007, vol. 584, pp. 322–332.
64. Belardi RP, Pawliszyn JB. *The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns*. Water Qual Res J Canada., 1989, vol. 24, pp. 179–191.
65. Zhang Z, Pawliszyn J. *Analysis of organic compounds in environmental samples by headspace solid phase microextraction*. J High Resolut Chromatogr., 1993, vol. 16, pp. 689–692.
66. Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. J Chromatogr A., 2000, vol. 880, pp. 35–62.
67. Hawthorne SB, Miller DJ, Pawliszyn J, Arthur CL. *Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers*. J Chromatogr A., 1992, vol. 603, pp. 185–191.
68. Jia M, Zhang Q, Min D. *Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice*. J Agric Food Chem., 1998, vol. 8561, pp. 2744–2747.
69. Kataoka H, Saito K. *Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis*. J Pharm Biomed Anal., 2011, vol. 54, pp. 926–950.
70. Pawliszyn J. *Theory of Solid-Phase Microextraction*. J Chromatogr Sci., 2000, vol. 38, pp. 270–278.
71. Shirey R, Mindrup R. *SPME-Adsorption versus Absorption: Which Fiber is Best for Your Application?* SUPELCO Tech Present. 1999

72. Mills G a, Walker V. *Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials*. J Chromatogr A., 2000, vol. 902, pp. 267–287.
73. Matich A. J. in *Applications of solid phase microextraction*. RSC Chromatography monographs, 1999.
74. Lord H. in *Applications of solid phase microextraction*. RSC Chromatography monographs 1999.
75. Neves HJC, Freitas AMC. *Introdução à cromatografia gás-líquido de alta resolução*. 1<sup>a</sup>ed. Dias de Sousa, Lta., 1996.
76. Hübschmann, Hans-Joachim. *Handbook of GC/MS: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2008.
77. Gfrerer M, Lankmayr E. *Screening, optimization and validation of microwave-assisted extraction for the determination of persistent organochlorine pesticides*. Anal Chim Acta. 2005, vol. 533, pp. 203–211.
78. Turner C, Whitehand LC, Nguyen T, McKeon T. *Optimization of a Supercritical Fluid Extraction/Reaction Methodology for the Analysis of Castor Oil Using Experimental Design*. J Agric Food Chem., 2004, vol. 52, pp. 26–32.
79. Araujo PW, Brereton RG. *Experimental design II. Optimization*. Trends Anal Chem., 1996, vol. 15, pp. 63–70.
80. Teófilo RF, Ferreira MMC. *Chemometrics II: Spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial*. Quim Nova., 2006, vol. 29, pp. 338–350.
81. Massart DL, Vandeginste BG., Buydens LMC, de Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A.*, Amsterdam, 1977.
82. Harris DC. *Quantitative Chemical Analysis*. 5<sup>th</sup> ed. W.H. Freeman and Company, 1999.
83. AACC. Method No 10-54. In *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, 2000.
84. Shrivastava A, Gupta VB. *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods.*, 2011, vol. 2, pp. 21–5.
85. Gökmen V, Açar ÖÇ, Arribas-Lorenzo G, Morales FJ. *Investigating the correlation between acrylamide content and browning ratio of model cookies*. J Food Eng., 2008, vol. 87, pp. 380–385.
86. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. *Handbook of Enology Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2<sup>nd</sup> ed. England: John Wiley & Sons, 2006.

87. Bakuradze T, Lang R, Hofmann T, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I. *Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell-free systems and human colon cell lines*. Mol Nutr Food Res. 2010, vol.54, pp. 1734–1743.
88. Davis T, Volesky B, Mucci A. *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae*. Water Res. 2003, vol. 37, pp. 4311–4330.
89. Mani V. in *Applications of solid phase microextraction*. RSC Chromatography monographs, 1999.
90. Pacchiarotta T, Nevedomskaya E, Carrasco-Pancorbo A, Deelder AM, Mayboroda O. *Evaluation of GC-APCI/MS and GC-FID as a complementary platform*. J Biomol Tech., 2010, vol. 21, pp. 205–213.
91. Recommendation (EC). *No 647/2013 of the European Council of 8.11.2013* (OJ, L 301, 2013, pp. 15-17).
92. Tiwari U, Cummins E. *Dietary exposure assessment of beta-glucan in a barley and oat based bread*. Food Sci Technol., 2012, vol. 47, pp. 413–420.
93. Wrigley C, Corke H, Walker CE. *Encyclopedia of grain science*. Elsevier academic press, 2004.
94. Ciesarová Z, Kukurová K, Mikusova L, Basil E, Polakoviova P, Duchonovam L. *Nutritionally enhanced wheat-oat bread with reduced acrylamide level*. Qual Assur Saf Crop Foods., 2014, vol. 6, pp. 327–334.
95. Jezussek M, Schieberle P. *A New LC / MS-Method for the Quantitation of Acrylamide Based on a Stable Isotope Dilution Assay and Derivatization with 2-Mercaptobenzoic Acid . Comparison with Two GC / MS Methods*. J Agric Food Chem., 2003, vol. 51, pp. 7866–7871.
96. Borderías AJ, Sánchez-Alonso I, Pérez-Mateos M. *New applications of fibres in foods: Addition to fishery products*. Trends Food Sci Technol., 2005, vol. 16, pp. 458–465.





## 7. Anexos

Tabela 12 - Resultados de L\*ab da parte superior de bolachas.

<b>Sacarose</b>	<b>Bolachas</b>	<i>L</i>	stdv	<i>a</i>	stdv	<i>b</i>	stdev
	<b>Controlo</b>	63,74	3,365	11,71	1,975	37,13	0,495
	<b>0,5 % HMWM</b>	51,08	0,97	10,74	1,02	28,63	0,55
	<b>Controlo</b>	64,1	1,76	11,89	0,98	37,26	0,26
	<b>0,1 % HMWM</b>	60,24	0,9	11,2	0,57	34,94	0,38
	<b>Controlo</b>	66,265	2,85	10,545	1,715	37,465	0,43
	<b>0,1 % HMWM + 1 % TA</b>	64,28	0,655	8,66	0,535	31,5	0,76
<b>Frutose</b>	<b>Controlo</b>	55,805	1,795	16,445	0,295	39,69	1,445
	<b>Pectina 5%</b>	58,115	2,88	11,085	1,655	35,735	0,695
	<b>Pectina deterificada 2%</b>	*					
	<b>Ácido alginico 2%</b>	*					
	<b>Controlo</b>	54,29	1,755	16,795	0,405	39,33	1,38
	<b>Polissacídeos 1% + 0,2% TA</b>	55,125	1,47	13,875	0,435	33,835	0,435

\*nos modelos com adição destes extratos não foi medida a cor.

Tabela 13 - Resultados de L\*ab da parte inferior de bolachas.

<b>Sacarose</b>	<b>Bolachas</b>	<i>L</i>	stdv	<i>a</i>	stdv	<i>b</i>	stdev
	<b>Controlo</b>	58,47	5,05	13,615	3,045	38,495	2,03
	<b>0,5 % HMWM</b>	48,99	1,32	12,48	1,49	32,2	0,6
	<b>Controlo</b>	56,72	2,43	15,11	0,85	39,31	1,62
	<b>0,1 % HMWM</b>	54,04	1,31	14,58	0,52	36,64	0,66
	<b>Controlo</b>	59,94	4,89	13,25	2,56	39,39	1,62
	<b>0,1 % HMWM + 1 % TA</b>	63,905	5,285	10,7	4,245	33,39	4,055
<b>Frutose</b>	<b>Controlo</b>	45,02	3,775	19,695	0,56	38,575	2,895
	<b>Pectina 5%</b>	56,955	5,425	13,445	2,31	33,605	2,75
	<b>Pectina deterificada 2%</b>	*					
	<b>Ácido alginico 2%</b>	*					
	<b>Controlo</b>	43,875	2,98	19,915	0,31	37,55	2,85
	<b>Polissacídeos 1% + 0,2% TA</b>	47,22	3,53	17,575	0,91	36,355	1,845

\*nos modelos com adição destes extratos não foi medida a cor.

