U.PORTO

FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

estrado em Controlo de Qualidade

DETERMINAÇÃO DE CLORETOS EM PÃO

Sofia Almeida

Determinação de Cloretos em Pão

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 09 / 11 / 2007
Reg. 5579
Cota

FFM
ALM
5579

Sofia Almeida

2007

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para obtenção de grau de Mestre em Controlo de Qualidade na área científica Água e Alimentos (Resolução nr. 8/SC/SG/93, D.R. nr. 126, II série 31/05/93)

Porto, 2007

Trabalho realizado, sob orientação da Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira e co-orientação da Professora Doutora Maria Goreti Ferreira Sales, no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em parceria com o GRAQ (Grupo de reacção e análise química) do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP) e com o Centro de Qualidade Hídrica do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Delegação do Porto.

Título	Determinação de Cloretos em pão
Autor(a)	Sofia Alexandra Alves Almeida
Orientador(a)	Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto de Oliveira
Co-Orientador(a)	Professora Doutora Maria Goreti Ferreira Sales
Data da publicação	Setembro 2007

Agradecimentos

À Doutora Maria Goreti Sales pelo acompanhamento científico, pela confiança que depositou em mim e por toda a disponibilidade e incentivo; mesmo longe, nunca me deixou sozinha.

À Dra. Beatriz Oliveira e à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto agradeço por me ter orientado e aceite como aluna de mestrado.

À Dr.ª Ana Margarida Heitor, assessora do Centro de Qualidade Hídrica do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge por toda a colaboração disponibilizada ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Dr.ª Ilídia, da Administração Regional de Saúde do Centro, por ter enviado as amostras de Coimbra.

À Felismina, do GRAQ, por todo o apoio prestado.

A todas as pessoas do laboratório de química de águas do Centro de Qualidade Hídrica do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge que, em algum momento, contribuíram com os seus saberes e/ou amizade para levar a bom termo a presente dissertação.

Aos meus pais e restante família pela ajuda que me foram dando, principalmente na compra e preparação da amostra.

Ao Rafael por todo o apoio e compreensão.

Índice Sistemático

I. INTRODUÇÂO I.1

I.1. GENERALIDADES SOBRE O PÃO I.1

I.1.1. História I.2

I.1.2. Tipos de pão I.3

I.1.3. Consumo I.5

I.2. CONSTITUINTES DO PÃO I.8

I.2.1. Farinha de trigo I.8

I.2.2. Água I.10

I.2.3. Fermento I.10

I.2.4. Cloreto de Sódio I.11

I.2.5. Estrutura I.12

I.2.6. Aditivos I.13

I.3. EFEITOS NA SAÚDE I.15

I.3.1. Consumo de Pão I.15

I.3.2. Consumo de Sal I.15

I.4. MONITORIZAÇÃO DA QUALIDADE I.24

I.4.1. Características organolépticas I.24

I.4.2. Características analíticas I.24

I.4.3. Métodos de Análise I.25

I.5. MONITORIZAÇÃO DE NACL I.26

I.5.1. Catião Sódio(Na^+) I.26

I.5.2. Anião Cloreto(Cl^-) I.27

I.5.3. Métodos Clássicos I.27

I.5.4. Método de Mohr I.28

I.5.5. Métodos Instrumentais I.30

I.6. MÉTODOS ÓPTICOS I.33

I.7. MÉTODOS SEPARATIVOS I.37

I.8. MÉTODOS ELECTROANALÍTICOS I.41

II. POTENCIOCIOMETRIA II.46

II.1. GENERALIDADES II.46

II.2. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS II.47

II.3. FIA EM POTENCIOMETRIA II.51

II.4. Aplicação à análise de alimentos II.56

III. PARTE EXPERIMENTAL III.58

III.1. Considerações Gerais III.58
III.2. Material e Aparelhos Utilizados III.58
III.3. Reagentes III.61
III.4. Soluções III.62
III.5. Construção dos Eléctrodos Tubulares III.63
III.6. avaliação comparativa dos Eléctrodos III.63
III.7. Estudo da Influência do pH III.65
III.8. Avaliação da Selectividade dos Eléctrodos III.66
III.9. Optimização do sistema III.66
III.10. Preparação das amostras III.66
III.11. Análise das amostras III.67
III.11.1. Análise Potenciométrica III.67
III.11.2. Análise pelo Método de comparação III.68
III.12. Validação DO método de comparação III.69
III.13. Análise estatística dos resultados III.70

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO IV.71

IV.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS IV.71
IV.2. Selecção do comprimento do eléctrodo IV.72
IV.3. EFEITO DO PH IV.75
IV.4. características de selectividade IV.76
IV.5. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS IV.78
IV.6. Validação do método potenciométrico IV.85
IV.7. aplicação analítica IV.87
IV.7.1. Teores de cloreto obtidos por ambos os métodos IV.89
IV.7.2. Relação do teor de sal com o teor de cloretos. IV.93
IV.7.3. Efeito do tipo de pão no teor de cloretos IV.97
IV.7.4. Variação do teor de cloreto no pão segundo os locais de venda IV.99
IV.7.5. Variação do teor de sal em algumas cidades IV.100

V. CONCLUSÕES V.105

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS VI.106

VII. ANEXOS VII.113

Índice de figuras

Figura I-1 Diferentes tipos de pão I.3
Figura I-2 Rodas dos Alimentos utilizadas. A: antiga; B: actual. I.7
Figura I-3 Estrutura química da amilose (a) e da amilopectina (b). I.9
Figura I-4 Célula de *Saccharomyces cerevisiae* em imagem tridimensional (lado esquerdo) e seus nucléolos (lado direito). I.11
Figura I-5 Estrutura cristalina do NaCl (lado esquerdo) e as cargas e dimensões relativas dos seus iões (lado direito). I.13
Figura I-6 Factores fisiológicos inter-relacionados que contribuem para a regulação da pressão arterial I.20
Figura I-7 Distribuição percentual da aplicação dos vários métodos instrumentais na determinação de cloretos I.32
Figura II-1 Sistema de referência para o eléctrodo de pH de "Ross" II.47
Figura II-2 Características gerais da curva de calibração II.48
Figura II-3 Representação gráfica do tempo de resposta, t ($\Delta E/\Delta t$), de uma célula de eléctrodo selectivo de ião. II.49
Figura II-4 Configuração usual das montagens FIA contendo ISEs para leitura directa (A) e para o ajuste às condições de leitura no interior do sistema. SP: sistema de propulsão; SI: sistema de injecção; ET: eléctrodo de terra; SD: sistema de detecção; UR: unidade de reacção; C: soluções de transporte (C_1 é geralmente uma solução ajustadora) ... II.52
Figura II-5 O arranjo típico em "cascata", utilizado para a adaptação dos ISEs de configuração convencional aos sistemas FIA. II.52
Figura II-6 O arranjo em *flow-through caps*, utilizado para a adaptação dos ISEs de configuração convencional aos sistemas FIA. II.53
Figura II-7 O arranjo típico em *Wall-jet*, utilizado para a adaptação dos ISEs de configuração convencional aos sistemas FIA. ER: eléctrodo de referência; (a): solução de referência interna do eléctrodo selectivo. II.53
Figura II-8 Arranjos típicos de ISEs de configuração tubular em sistemas FIA. A: com solução de referência interna, (a); B: sistema sensor em contacto com um suporte condutor, (b) II.54
Figura II-9 Sinais analíticos correspondentes a condições equivalentes ao estado estacionário (H0) e após injecção de um volume de amostra (H). II.55
Figura II-10 Relação percentual de aplicação de métodos potenciométricos à análise de alimentos e de bebidas. II.57
Figura II-11 Distribuição percentual dos métodos potenciométricos em FIA dedicados à análise de produtos alimentares. II.57

Figura III-1 Montagem FIA utilizada para avaliação e aplicação dos eléctrodos selectivos. POT: decimilivoltímetro; REG: registador. III.59
Figura III-2 Bomba peristáltica. Sistema de propulsão utilizado nas montagens FIA. ... III.59
Figura III-3 Eléctrodo de prata/cloreto de prata de dupla junção. III.60
Figura III-4 Preparação do eléctrodo indicador. Adaptação do fio condutor interno de um cabo eléctrico blindado a um tubo de aço com 0,8 mm de d.i. e cerca de 12 mm de comprimento. Fixação do fio condutor ao tubo de aço com solda. III.63
Figura III-5 Condicionamento do eléctrodo selectivo pela adaptação de tubos de Teflon® nas extremidades do mesmo às quais se adaptavam "luvas". III.63
Figura III-6 Montagem FIA de baixa dispersão adaptada à avaliação da influência do pH no comportamento dos detectores tubulares. B: bomba peristáltica; I, válvula de injecção; C: canal de transporte da solução transportadora; ET: eléctrodo de terra; ESM: eléctrodo selectivo de MT; ER: eléctrodo de referência; E: esgoto; mV: decimilivoltímetro; R: registador; EV: eléctrodo de vidro. III.65
Figura III-7 Representação da Montagem de FCS usada no método de comparação. ... III.69
Figura IV-1 Registos típicos das curvas de calibração dos eléctrodos tubulares com 1,0 e 1,5 cm de comprimento e as concentrações das soluções padrão correspondentes (em mol L^{-1}). IV.73
Figura IV-2 Registos típicos das curvas de calibração dos eléctrodos tubulares com 3,0 e 6,0 cm de comprimento e as concentrações das soluções padrão correspondentes (em mol L^{-1}). IV.73
Figura IV-3 Registo da repetibilidade do sinal analítico para o ISE de 1,0 cm. IV.74
Figura IV-4 Diagrama de Reilley para uma concentração de cloreto igual a $1,0x10^{-3}$ mol L^{-1}. IV.75
Figura IV-5 Representação gráfica dos coeficientes de selectividade K^{POT}. IV.78
Figura IV-6 Registo típico de uma curva de calibração do eléctrodo tubular com 1,0 cm de comprimento e as concentração das soluções padrão correspondentes (concentrações em mol L^{-1}) para soluções de força iónica 1,0 mol L^{-1}. IV.79
Figura IV-7 Registo típico de uma curva de calibração do eléctrodo tubular com 1,0 cm de comprimento e as concentração das soluções padrão correspondentes (concentrações em mol L^{-1}) para soluções de força iónica 0,01 mol L^{-1}. IV.79
Figura IV-8 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com caudais de 1,7 e 2,5 mL min^{-1}. IV.82
Figura IV-9 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com caudais de 3,4 e 4,2 mL min^{-1}. IV.82
Figura IV-10 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com volumes de injecção de 100 e 200 μL IV.83
Figura IV-11 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com volumes de injecção de 300 e 450 μL IV.83

Figura IV-12 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com volumes de injecção de 550 μL IV.84
Figura IV-13 Variação do Declive e Frequência Amostral em função do volume de injecção. IV.84
Figura IV-14 Variação do Declive e Frequência Amostral em função do caudal. IV.85
Figura IV-15 Regressão entre os dois métodos utilizados na análise de pão IV.87
Figura IV-16 Regressão entre os dois métodos utilizados na análise de pão (linha a tracejado corresponde à linha de tendência dos valores previstos). IV.90
Figura IV-17 Diagrama de caixa e bigodes para as amostras de pão da região Norte (valores de mg/L em Y) IV.92
Figura IV-18 Diagrama de caixa e bigodes para as amostras de pão da região de Coimbra (valores de mg/L em Y). IV.93
Figura IV-19 Representação dos valores de sódio e o valor equivalente em sódio esperado pela adição de NaCl ao pão, por FIA. IV.96
Figura IV-20 Representação dos valores de sódio e o valor equivalente em sódio esperado pela adição de NaCl ao pão, por FIA. IV.96

Índice de tabelas

Tabela I-1 Teor de sal em alimentos, associado à percepção do consumidor I.16
Tabela I-2 Produtos alimentares com teores de sal elevados. I.17
Tabela I-3 Efeitos da ingestão moderada e excessiva de sal. I.18
Tabela I-4 Valores adequados de ingestão diária de sódio e sal. I.23
Tabela I-5 Determinação de cloretos por FIA com detecção UV/VIS I.35
Tabela I-6 Determinação de cloretos por SIA com detecção UV/VIS I.36
Tabela I-7 Determinação de cloretos por cromatografia iónica com detecção condutimétrica I.39
Tabela I-8 Determinação de cloretos por Electroforese capilar I.40
Tabela I-9 Determinação de cloretos por potenciometria em estado estacionário (EE) I.43
Tabela I-10 Determinação de cloretos por potenciometria em fluxo (FIA) I.44
Tabela I-11 Determinação de cloretos por potenciometria em SIA I.45
Tabela IV-1 Características gerais de funcionamento dos diferentes eléctrodos selectivos de cloreto. IV.72
Tabela IV-2 Valores de produto de solubilidade para alguns sólidos de prata IV.76
Tabela IV-3 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica calculados IV.77
Tabela IV-4 Características gerais de funcionamento do eléctrodo selectivo de cloreto de 1,0 cm para 0,01, 0,1 e 1,0 mol L^{-1} de força iónica. IV.80
Tabela IV-5 Características gerais de funcionamento do eléctrodo, selectivo a cloreto, obtidas em solução aquosa para diferentes caudais IV.81
Tabela IV-6 Características gerais de funcionamento do eléctrodo, selectivo a cloreto, obtidas em solução aquosa diferentes volumes de injecção. IV.81
Tabela IV-7 Concentrações de cloreto nas soluções de "amostras padrão", analisadas pelos métodos de cromatografia iónica (CI), de FCS e potenciométrico em FIA, e erros relativos (ER) correspondentes com relação à CI. IV.86
Tabela IV-8 Frequência amostral e percentagem dos vários tipos de pão da Região Norte... ..... IV.88
Tabela IV-9 Frequência amostral e percentagem dos vários tipos de pão de Coimbra. IV.88
Tabela IV-10 Valores de concentração de cloretos nas amostras analisadas. IV.89
Tabela IV-11 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos

presente nos diferentes tipos de Pão (Portaria 425/98), obtidos para FIA e FCS, adquiridos em Hipermercados e padarias locais da região Norte. IV.91

Tabela IV-12 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos presente nos diferentes tipos de Pão (Portaria 425/98), obtidos para FIA e FCS, adquiridos em Hipermercados e padarias locais da região de Coimbra. IV.91

Tabela IV-13 Teores de sódio nas amostras da região Norte obtidos com ESI de sódio e deduzidos a partir do método potenciométrico (em valor equivalente, Ceq) e os desvios relativos (DR) correspondentes..... IV.94

Tabela IV-14 Teores de sódio nas amostras da região do Coimbra obtidos com ESI de sódio e deduzidos a partir do método potenciométrico (em valor equivalente, Ceq) e os desvios relativos correspondentes. IV.95

Tabela IV-15 Valores de *p-value* do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk (região Norte). IV.97

Tabela IV-16 Valores de *p-value* do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk (região de Coimbra). IV.98

Tabela IV-17 *Subsets* de ANOVA para α= 0,05 e amostras da região do Norte..... IV.98

Tabela IV-18 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos presente nos diferentes Hipermercados da região Norte, obtidos por FIA e FCS..... IV.99

Tabela IV-19 Valores de *p-value* do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk (região Norte). IV.100

Tabela IV-20 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos presente nas diferentes cidades da região Norte, obtidos quer para FIA, quer para FCS. IV.101

Tabela IV-21 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos presente nas diferentes Freguesias da região de Coimbra, obtidos por FIA e FCS. ... IV.101

Tabela IV-22 Valores de p do teste de normalidade de Shapiro-Wilk para α= 0,05 (região norte). IV.102

Tabela IV-23 Valores de p do teste de normalidade de Shapiro-Wilk para α= 0,05 (região Coimbra). IV.103

Resumo

A presente dissertação descreve o desenvolvimento e a caracterização de um sistema de análise por injecção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection* Analysis) com detecção potenciométrica para a determinação de cloretos em pão.

O sistema FIA utilizado foi uma montagem de duplo canal, permitindo que todas as soluções analisadas fossem preparadas em água. A adequação do meio em estudo ao detector foi conseguida por confluência do troço de amostra injectada com uma solução de sulfato de sódio. Esta solução foi usada para ajustar a força iónica. O eléctrodo indicador foi um eléctrodo selectivo de cloreto, constituído por um tubo de prata (Ag) revestido com cloreto de prata (AgCl).

Para optimização do sistema proposto foram estudados eléctrodos com diferentes comprimentos. As unidades que revelaram melhores características, sobretudo com relação à frequência analítica, foram as de 1,0 cm de comprimento. Outros parâmetros optimizados foram a concentração do ajustador de força iónica, o caudal e o volume de injecção. Os valores óptimos encontrados foram, respectivamente, 0,1 mol L^{-1}, 2,5 mL min^{-1} e 300 μL. Nestas condições as equações de calibração apresentavam declives médios de 56,55±0,43 mV década^{-1}, com frequências analíticas da ordem da 60 amostras h^{-1}.

O sistema proposto foi aplicado na análise de 250 amostras de pão, provenientes do Norte de Portugal (de Gaia até Braga) e da região de Coimbra. As amostras analisadas foram pão de trigo, pão integral, pão de centeio, pão de mistura, broa de milho, pão sem sal, pão meio sal, pão-de-leite e pão de água. Estas amostras foram recolhidas em hipermercados e em padarias locais. Para cada hipermercado foram escolhidos três locais de venda, localizados em cidades diferentes.

Os resultados analíticos do método proposto foram validados através da análise de amostras sem sal fortificadas com padrão de NaCl e comparação dos resultados obtidos com um método de cromatografia iónica (certificado pela norma NP EN ISO 17025:2005) e um método baseado em fluxo contínuo segmentado, ambos estabelecidos para análises de rotina no Centro de Qualidade Hídrica do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Delegação do Porto. Todas as amostras de pão foram analisadas pelo método potenciométrico (POT) proposto e pelo método de fluxo contínuo segmentado (FCS). Os resultados obtidos pelos dois métodos são comparáveis, com erros relativos inferiores a 10%. A correlação linear entre ambos apresenta um valor de valor de R^2 de 0,9483.

Os teores de cloretos variaram entre 110 e 1498 mg/100 g de pão. Os pães sem sal apresentaram teores de cloreto entre 72 e 82 mg/100g e o meio sal entre 232 e 884 mg/100 g de pão. No entando, não foi possível estabelecer uma correlação constante entre

os teores de sódio e de cloreto nas amostras de pão. Não foram encontradas diferenças significativas entre os teores determinados em amostras adquiridas nos vários hipermercados e padarias locais, para um intervalo de confiança de 95 %.

Abstract

A flow injection analysis (FIA) system with potentiometric detection is developed and evaluated for the determination of chloride in bread.

The FIA system was of double-channel. All solutions were prepared in water and necessary ionic strength adjustments were achieved by confluenting sample plug with sodium sulphate solution. Indicating electrode was made of silver (Ag) tube covered by silver chloride (AgCl).

Electrodes of different lengths were tested. Devices of 1,0 cm presented the best analytical features, regarding mainly analytical frequency. Other optimized parameters were ionic strength adjuster concentration, flow rate and injection volume. Experimental parameters selected after this were, respectively, 0.1 mol L^{-1}, 2.5 mL min^{-1}, and 300 μL. Resulting calibration curves had average slopes of 56.55±0.43 mV $década^{-1}$, with sampling rates of 60 samples h^{-1}.

The method was applied to the analysis of 250 samples of bread, providing from the North region of Portugal, including Coimbra. The samples were pão *de trigo, pão integral, pão de centeio, pão de mistura, broa de milho, pão sem sal, pão meio sal, pão-de-leite,* and *pão de água.* These samples were collected from national supermarket groups (three different cities were selected for each group), and from traditional bread/bakery stores.

Fortified bread samples were analysed by independent methods to validate the analytical results from the proposed method. These methods were based on ionic chromatography (certified by NP EN ISO 17025:2005), and segmented continuous flow, both of them used for routine analytical purposes at the *Qualidade Hídrica* center of the *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Porto delegation*. All samples were analysed by the proposed potentiometric method (POT) and the segmented continuous flow (FCS) one. Results of both methods are in good agreement, with relative errors below 10 % and R^2 of 0.9483 for their linear correlation.

Regular bread samples have 110 to 1498 mg of chloride/100 g. Samples "without salt" and "medium-salt" have lower chloride concentrations, ranging 72 to 82 and 232 to 884 mg/100 g, respectively. However, no correlation was found between the levels of sodium and chloride in bread. No significant differences were obtained within samples from supermarkets and traditional stores, at a 95 % confidance level.

Abreviaturas

EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos
CQH	Centro de Qualidade Hídrica
CI	Cromatografia Iónica
ISE	Eléctrodo Selectivo de Ião
ER	Erro Relativo
FIA	*Flow Injection analysis*
FCS	Fluxo contínuo segmentado
FA	Frequência Analítica
LD	Limite de detecção
LIRL	Limite inferior de resposta linear
POT	Método Potenciométrico
p	*p-value*
SIA	Análise por Injecção Sequencial
UV/VIS	Ultra-violeta/Visível
Ceq	Valor equivalente

I. INTRODUÇÃO

I.1. GENERALIDADES SOBRE O PÃO

O pão é o produto obtido da amassadura, fermentação e cozedura, em condições adequadas, das farinhas de trigo, centeio, triticale ou milho, estremes ou em mistura, água potável e fermento ou levedura, sendo ainda possível a utilização de sal e de outros ingredientes, incluindo aditivos, bem como auxiliares tecnológicos, nas condições legalmente fixadas [1].

Os produtos afins do pão são os obtidos a partir de massas levedadas e ou sovadas, do tipo panar, fabricadas em formatos que não se confundam com os adoptados para o pão, sendo ainda possível a utilização de ingredientes, incluindo aditivos, bem como auxiliares tecnológicos nas condições legalmente fixadas [1].

Com maior ou menor incidência, o pão faz parte dos hábitos alimentares da população mundial. É, hoje em dia, um dos alimentos mais consumidos pela humanidade, principalmente no Ocidente [2]. Este hábito transversal às mais diversas culturas e tradições, arrasta-se ao longo de milénios. A arte de fazer pão remonta aos primeiros tempos da sedentarização do Homem, no Extremo Oriente...

Na sua origem, o pão apresentava uma cor escura, sendo produzido com farinha não peneirada e cozido sobre pedras ao sol. A variedade de formas e sabores que hoje existe é fruto do desenvolvimento das técnicas de fabrico e do apuramento do paladar, ao longo dos séculos nas várias regiões.

É estimado que o pão tenha surgido há 12 mil anos na Mesopotâmia juntamente com o cultivo do trigo [3]. Era feito de farinha misturada com o carvalho. Apresentando-se achatados, duros, secos e muitos amargos, eram assados ao fogo para poderem ser ingeridos.

Graças às enchentes do Nilo, o trigo e a cevada eram abundantes e permitiam aos egípcios o fabrico do pão e da cerveja. Este povo introduziu, por volta de 7000 a.C., uma nova estratégia para o fabrico de pão. Utilizou fornos de barro para a sua cozedura [2] e introduziram o fermento na receita. Teriam sido os hebreus, escravos do Egipto, os responsáveis pela descoberta da fermentação natural. Por volta de 2600 a.C. descobriram, por acaso, que a massa do pão exposta ao calor e à humidade tornava o produto final mais volumoso e macio. Os hebreus são também autores do pão ázimo, isto é, pão consumido antes de levedar, fruto da fuga precipitada de Moisés e do seu povo ao Faraó do Egipto.

Apesar de terem sido os egípcios a desenvolver e a divulgar o processo de fabrico do pão, foi com os gregos que este alimento passou a ocupar um lugar preponderante à mesa. Os sábios gregos viam numa alimentação correcta a melhor forma de manter a saúde e combater as doenças. O pão fazia parte da dieta alimentar na Antiga Grécia, como o comprova o "Banquete dos Sofistas" de Ateneu e os tratados de dietética de Hipócrates, o pai da Medicina, que aconselhava os seus pacientes a comer pão integral "devido ao efeito salutar sobre os intestinos" [2].

Também para os Romanos o pão desempenhava um papel muito importante. Esta importância ficou patente na expressão "Pão e Circo": pão como esmola para um povo que vivia miseravelmente e espectáculos brutais como única fonte de diversão [2]. A produção de pão nessa altura era já indicativa da necessidade de padarias. No século II, os Romanos introduziram este conceito, com o desenvolvimento das padarias públicas.

Com a expansão do Império Romano, também o pão se propagou pelo Ocidente, nomeadamente pela Península Ibérica. A queda deste império traz, porém, o encerramento das padarias e o pão passou a ser feito em casa. A Igreja Católica foi, nessa altura, a grande motora da manutenção e divulgação do hábito de comer pão, através da celebração da Eucaristia e da troca de receitas entre mosteiros e conventos.

Como em muitas outras áreas do conhecimento, as técnicas de fabrico do pão regrediram na Idade Média. Em certas regiões, o pão voltou a ser escuro, pobre e grosseiro, sendo comido duro juntamente com caldos e sopas. Só a nobreza e parte do clero podiam aceder ao trigo e muitas casas senhoriais tinham os seus próprios padeiros, que foram, a pouco e pouco, difundindo de novo o seu saber.

No fundo, o pão surge desde os primórdios da humanidade e tem sido sujeito a muitas alterações, fruto dos tempos e das sociedades. A sua importância e diversidade no nosso planeta, originaram o aparecimento do Museu do Pão. Este museu conta, de forma mais detalhada, a história deste alimento através dos tempos, recriando o ciclo do pão português e abordando o seu papel político, religioso, artístico e social [2].

I.1.2. Tipos de pão

Fazendo parte da base da dieta alimentar mediterrânica, o pão conhece inúmeras variedades conforme a região onde é produzido. Em Portugal são conhecidas mais de 100 variedades (Figura I-1) [4]. A matéria-prima (trigo, milho ou centeio) utilizada tem a ver com o clima e com a zona do país. Dentro do pão de milho, pão de trigo, pão de centeio, pão de mistura ou pão integral, é possível obter vários tipos de pão conforme o processo de fabrico e o tipo de fermentação. Já a diferença entre os formatos deve-se aos fornos comunitários. Cada pessoa ou cada família fazia a sua massa que depois era cozida no forno comunitário. Como a mesma fornada tinha massas de várias famílias, para se distinguirem os pães uns dos outros começaram a fazer marcas nos pães, daí se obterem as diversas tenduras que se foram aperfeiçoando e variando ao longo dos tempos.

Figura I-1 Diferentes tipos de pão

A constituição do mercado único europeu e a importância de que se reveste o consumo de pão, reconhecido mundialmente como um elemento fundamental na dieta da Humanidade, impôs a necessidade de definir regras relativas ao fabrico e à comercialização de pão. Actualmente, a legislação nacional relativa à fixação das características do pão e às suas condições de fabrico aproxima-se das linhas comunitárias e permite promover a livre concorrência e a transparência do mercado, protegendo também a saúde e os interesses do consumidor.

De acordo com a legislação actual [1] poderão ser fabricados e comercializados os seguintes tipos de pão:

a) **Pão de trigo** - o pão fabricado com farinha de trigo dos tipos 45, 55, 65, 80 ou 110, água potável, sal e fermento ou levedura, podendo também ser utilizados farinha de glúten, extracto de malte, açúcares e os alguns aditivos específicos;

b) **Pão integral de trigo** - o pão de trigo fabricado com farinha de trigo do tipo 150;

c) **Pão de centeio** - o pão fabricado com farinha de centeio dos tipos 70, 85 ou 130, ou em mistura com farinha de trigo dos tipos 65, 80, 110 ou 150, desde que a farinha de centeio seja utilizada numa incorporação superior a 50%, água potável, sal, fermento ou levedura, podendo também ser utilizados extracto de malte, farinha de malte, açúcares e alguns aditivos específicos;

d) **Pão integral de centeio** - o pão de centeio fabricado com farinha de centeio do tipo 170;

e) **Pão de triticale** - o pão fabricado com farinha de triticale, de acordo com o estabelecido para o pão de centeio;

f) **Pão de mistura** - o pão fabricado com misturas de farinhas de trigo dos tipos 65, 80, 110 ou 150, de centeio dos tipos 70, 85, 130 ou 170 e de milho dos tipos 70, 100 ou 175, ou apenas com farinhas de dois destes cereais, com uma incorporação mínima de 10% de farinha de cada cereal, água potável, sal, fermento ou levedura, podendo também ser utilizados farinha de glúten, extracto de malte, farinha de malte, açúcares e alguns aditivos específicos;

g) **Pão de milho ou broa de milho** - o pão de mistura em cujo fabrico seja utilizado predominantemente qualquer dos tipos de farinha de milho;

h) **Pão especial** - o pão fabricado com qualquer dos tipos de farinha definidos na Portaria n.º 1023/94, de 22 de Novembro, estremes ou em mistura, água potável, sal, fermento ou levedura, podendo também ser utilizados, entre outros, farinha de glúten, extracto de

malte, farinha de malte, açúcares e aditivos específicos;

A legislação actual [1] consagra também o fabrico dos designados "pães especiais". Estes devem obedecer a características fixadas para que recebam as seguintes denominações de venda:

a) **Pão de ... enriquecido** - o pão especial em cujo fabrico sejam utilizados os elementos enriquecedores tiamina, riboflavina, niacina e ferro, dentro dos limites de 4,4 a 5,5; 2,6 a 3,3; 35 a 44; e 28 a 36 mg/kg de farinha, respectivamente; na denominação de venda deverá constar a indicação do cereal cuja farinha é utilizada no seu fabrico;

b) **Pão sem sal** - o pão especial sem incorporação de sal;

c) **Pão glutinado** - o pão especial fabricado com farinha de trigo com um teor de glúten seco, referido a matéria seca, superior a 16%;

d) **Pão de glúten** - o pão especial fabricado com farinha de trigo com um teor de glúten seco, referido a matéria seca, superior a 30%;

e) **Pão de ovos** - o pão especial com uma incorporação mínima de ovos frescos de 150g/kg de farinha, ou quantidade equivalente de ovos desidratados;

f) **Pão-de-leite** - o pão especial com uma incorporação mínima de leite em pó de 50g/kg de farinha, ou quantidade equivalente de outro produto lácteo;

g) **Pão tostado ou tosta de...** - o pão especial, cortado em fatias, que, por meio de torra especial, apresenta um teor de humidade inferior a 8%; na denominação de venda deverá constar a indicação do cereal, ou do tipo de farinha, utilizado no seu fabrico.

I.1.3. Consumo

Ao longo dos últimos anos assistiu-se à associação da imagem do pão à do alimento que engorda, levando ao decréscimo do consumo doméstico, menos de metade nos últimos 40 anos. Mesmo assim, o pão continua a ser um alimento base na dieta de muitas famílias, calculando-se que o consumo médio por pessoa seja de aproximadamente três fatias por dia [4].

Diversos especialistas aconselham o consumo do pão. O seu teor de fibras faz dele uma arma útil na prevenção e tratamento das perturbações intestinais. Rico em ferro e vitaminas, especialmente em vitaminas do complexo B, o pão é também uma valiosa fonte de cálcio, mineral essencial à formação e manutenção saudável dos ossos e dos dentes.

Naturalmente, o consumo de pão deve ser diário e moderado, associado a uma dieta equilibrada. A disseminação desta informação entre a população portuguesa é efectuada, habitualmente, através da Roda dos alimentos (Figura I-2, A). A forma circular utilizada associa-se ao prato vulgarmente utilizado às refeições, e a sua divisão por grupos permite identificar facilmente qual a proporção em que os alimentos de cada um desses grupos deve estar presente na alimentação diária. Incentiva a um maior consumo dos alimentos pertencentes aos grupos de maior dimensão e menor consumo daqueles que se encontram nos grupos de menor dimensão.

São 5 os grupos de alimentos considerados nessa Roda dos Alimentos: i) leite e derivados; ii) carne, peixe e ovos, iii) óleos e gorduras, iv) cereais, leguminosas e hortaliças; v) e legumes e frutos. Assim, cada grupo reúne alimentos nutricionalmente semelhantes entre si, que devem ser regularmente substituídos, entre si, de modo a assegurar a variedade alimentar.

A nova Roda dos Alimentos foi apresentada em 2003 e apresenta alterações no que diz respeito à subdivisão de alguns dos anteriores grupos e ao estabelecimento de porções diárias equivalentes [5]. A nova Roda dos Alimentos é composta por 7 grupos de alimentos de diferentes dimensões (Figura I-2, B), aos quais se associa a proporção de peso com que cada um deles deve estar presente na alimentação diária: i) cereais e derivados, tubérculos (28 %); ii) hortícolas (23 %); iii) fruta (20 %); iv) lacticínios (18 %); v) carnes, pescado e ovos (5 %); vi) leguminosas (4 %); vii) e gorduras e óleos (2 %). Cada grupo, apresenta funções específicas e características nutricionais específicas, pelo que todos eles devem estar presentes na alimentação diária.

A água, não possuindo um grupo próprio, está também representada em todos eles, pois faz parte da constituição de quase todos os alimentos. Sendo a água imprescindível à vida, é fundamental que se beba em abundância diariamente. As necessidades de água podem variar entre 1,5 e 3 litros por dia.

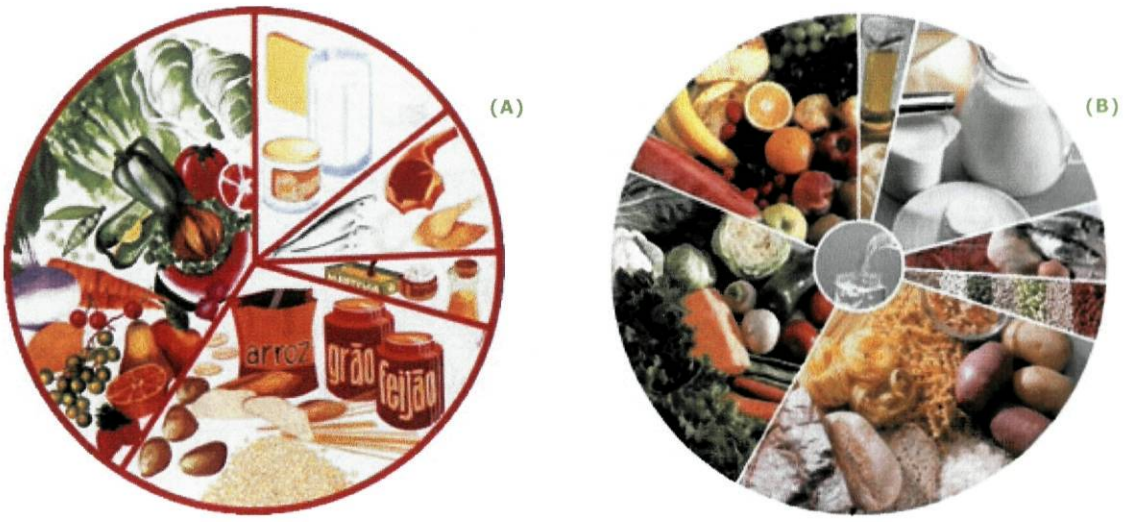


Figura I-2 Rodas dos Alimentos utilizadas. A: antiga; B: actual.

No sentido de melhorar a saúde dos portugueses, o Conselho Nacional de Alimentação e Nutrição, Comissão de Educação Alimentar, estabeleceu, em 1997, algumas recomendações de ordem nutricional. Entre outros aspectos, constam dessas recomendações:

a) o aumento do consumo de hidratos de carbono complexos e fibra;

b) a redução do consumo de sacarose, sódio e álcool;

c) a ingestão adequada de cálcio.

Estas recomendações foram complementadas com algumas especificações de natureza alimentar, nomeadamente:

a) o consumo adequado de cereais e seus derivados, como o pão e outros, batatas e leguminosas;

b) a redução do consumo de açúcar e de produtos açucarados;

c) a redução do consumo de sal;

d) a ingestão alimentar variada e fraccionada, em pelo menos, cinco refeições diárias;

Neste sentido, e no que diz respeito ao pão, o seu consumo deve ser mantido, desde que, tal como para outros alimentos, seja feito de uma forma equilibrada e moderada.

I.2. CONSTITUINTES DO PÃO

O fabrico do pão envolve a preparação da massa, a sua levedação e a cozedura no forno. Apesar da grande variedade de pães disponíveis no mercado, o pão apresenta na sua composição alguns compostos comuns e, para além destes, pode conter aditivos permitidos pela legislação. De uma forma geral, os componentes básicos do pão que os portugueses consomem são:

a) farinha de trigo;

b) água;

c) fermento biológico (fermento de padeiro);

d) e sal (cloreto de sódio).

I.2.1. Farinha de trigo

A farinha de trigo é constituída por vários componentes, todos eles muito importantes para a qualidade final do pão, sendo os mais relevantes, o amido e as proteínas.

A farinha contém cerca de 70 % de amido. O amido constitui a reserva alimentar das plantas e é formado por moléculas de glucose. As moléculas de amido podem ser lineares (amilose) ou ramificadas (amilopectina). No polímero linear de moléculas de glucose, as unidades de glucose encontram-se unidas por ligações glicosídicas α-1,4. Este polissacarídeo possui estrutura helicoidal e é solúvel em água. A amilopectina é, por sua vez, um polímero ramificado em que as moléculas de glucose se encontram unidas entre si por ligações glicosídicas α-1,4 e α-1,6 (nas ramificações). As ramificações estão presentes em cerca de 1/25 das moléculas de glucose.

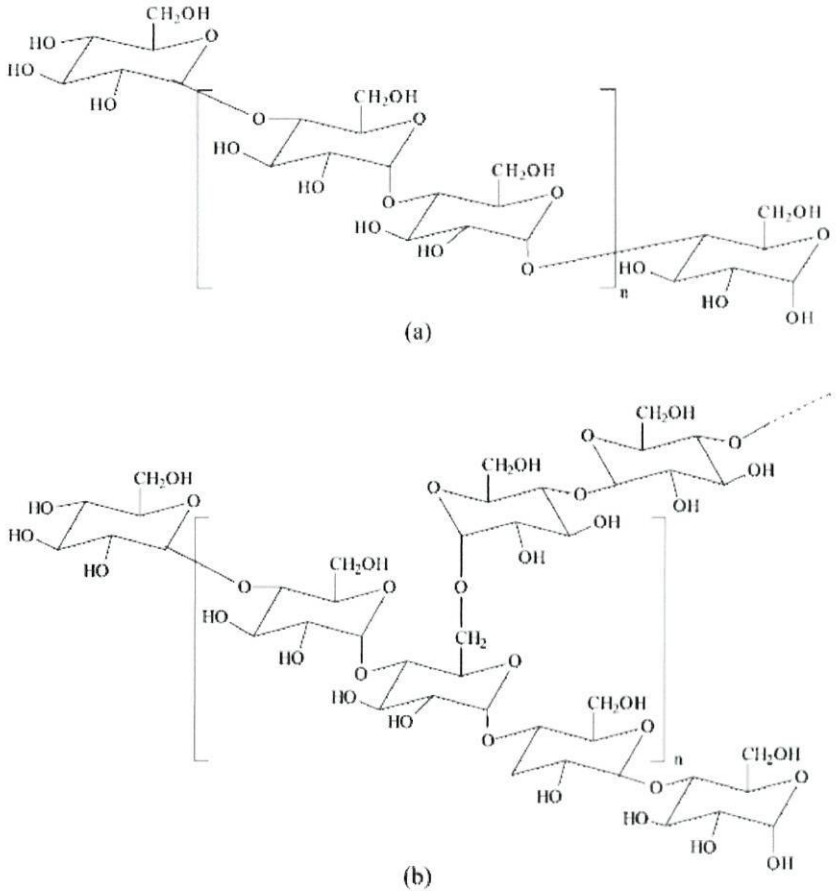


Figura I-3 Estrutura química da amilose (a) e da amilopectina (b).

As proteínas na farinha de trigo são responsáveis pela estrutura moderadamente elástica do pão quando da fermentação.

O Glúten é uma proteína elástica amorfa que se encontra na semente de muitos cereais combinada como amido. Representa 80% das proteínas de trigo e é composta de gliadina e glutenina. O glutén é responsável pela elasticidade da massa da farinha, o que permite a sua fermentação, assim como a consistência elástica esponjosa dos pães e bolos.

Nos estabelecimentos de fabrico de pão e produtos afins só poderão existir farinhas que satisfaçam as condições legalmente estabelecidas para o acondicionamento, transporte, armazenamento e rotulagem de farinhas e sêmolas destinadas à indústria, sem prejuízo do disposto no restante articulado da legislação relativa a esses produtos [1].

Um grão de trigo é uma estrutura complexa. Do ponto de vista genético existem duas espécies de trigos: o trigo mole - *Triticum aestivum*, adequado à padaria, pastelaria e ao fabrico de bolachas, cujo produto da moenda é a farinha; e o trigo duro - *Triticum durum*, usado no fabrico de massas alimentícias, cujo produto de moenda é a sêmola [6].

No decorrer do processo de moagem o trigo passa por várias fases de limpeza sendo-lhe retirado o gérmen. O tipo de farinha que se obtém é determinado pela fase seguinte, de trituração e peneiração. O tipo de farinha dependerá do maior ou menor grau de extracção da farinha.

Num dos extremos está a farinha integral que utiliza todos os componentes de um grão de trigo, e que apresenta uma cor escura e no extremo oposto está a farinha 45, que utiliza apenas o endosperma, que se encontra no núcleo do trigo e é branca. Entre estes dois extremos encontram-se os outros tipos de farinha. Uma farinha 45 produz um pão com miolo muito branco enquanto uma farinha 110, tem muita casca e produz um pão escuro.

I.2.2. Água

Os componentes hidrófilos do pão vão dissolver-se na água. A quantidade de água absorvida depende da qualidade da farinha de trigo. Uma farinha de boa qualidade tem boa absorção de água e retenção da humidade durante o processamento da massa. São obtidos melhores resultados, quanto ao volume, quando o teor de água absorvido é o maior possível antes da massa se tornar pegajosa. Porém, o volume não depende apenas da absorção de água mas também do tempo de amassamento [7].

I.2.3. Fermento

O fermento utilizado em panificação é constituído pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura foi identificada por Pasteur, no século XIX [8]. A *S. cerevisiae* é um organismo eucariótica unicelular. As células são esferas alongadas com um proeminente vacúolo central e pequenos nucléolos periféricos (Figura I-4).

As *Saccharomyces* são muito importantes do ponto de vista económico por se encontrarem associadas a processos de fermentação do pão, da cerveja e do vinho e ao processo de fabrico de etanol. Apresentam também aplicações médicas, sendo usadas como probióticos em humanos. Esta aplicação em concreto está, porém, condicionada face ao registo de infecções causadas pela levedura [9]. Os autores da investigação em causa concluíram que a aplicação deste género em probióticos deve ser reconsiderada, embora a espécie em causa tenha sido a *S. boulardii*.

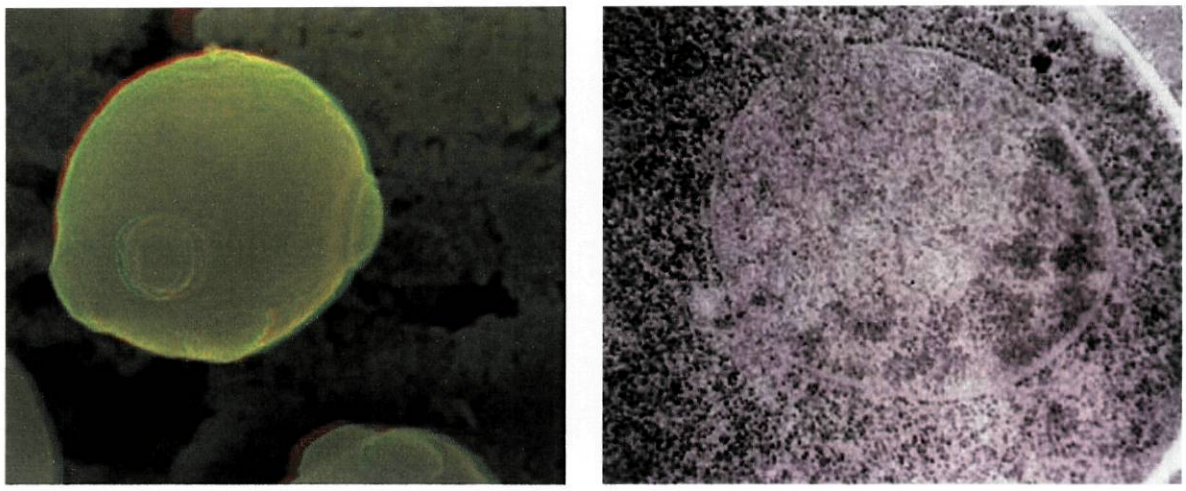


Figura I-4 Célula de *Saccharomyces cerevisiae* em imagem tridimensional (lado esquerdo) e seus nucléolos (lado direito).

As *Saccharomyces* são heterotróficas e obtêm a energia a partir da glucose. Elas utilizam tanto o metabolismo respiratório como o fermentativo. Efectuam o transporte activo de glucose para a célula, tendo em vista a sua metabolização. É por este motivo que ela é utilizada na fermentação.

No pão, a levedura consegue quebrar as ligações entre as moléculas de glucose do amido presente na farinha. Depois utiliza o açúcar, fermentando-o para obter energia, segundo a reacção:

$C_6H_20_6 \rightarrow 2\ CO_2 + 2\ C_2H_5OH$

Produz, portanto, em condições anaeróbias, dióxido de carbono (CO_2) responsável pelo crescimento da massa, para além de outros compostos que conferem ao pão o sabor e o aroma [8].

I.2.4. Cloreto de Sódio

O sal é uma substância essencial ao homem e indispensável a todos os tipos de vida animal. A sua produção e utilização datam do início da civilização, sendo a salga dos alimentos um costume bastante difundido no Egipto, cerca de 4000 a.C. [10]. Na Grécia e em Roma, o sal era utilizado como moeda nas operações de compra e venda. A palavra latina "salário" deriva de sal, uma vez que era pago em sal [10]. No final do século XIX, o sal que era antes usado como condimento e produto medicinal, passou a ser uma das matérias-primas essenciais para a indústria química e têxtil. Por isso, além de ser usado na preparação de alimentos, o sal é hoje utilizado para outros fins como na produção de cloro, soda cáustica, vidro e alumínio [10].

O sal, adicionado ao pão, interage com a formação da rede de glúten e controla a fermentação, devido ao efeito osmótico nas células da levedura. Para além destes aspectos relevantes do ponto de vista tecnológico, a sua função mais importante é a de fornecer sabor. Em termos gerais, a quantidade utilizada é de, aproximadamente, 2 % da quantidade de farinha de trigo [8].

No seu estado puro, o cloreto de sódio é abundante na natureza, sendo designado comummente como sal de cozinha. Já na forma física existem diferenças, principalmente na granulação [11]. Em termos comerciais, distinguem-se dois tipos de sal: o marinho e o de rocha. O sal marinho é extraído pela evaporação da água do mar; o sal de rocha é retirado de minas subterrâneas resultantes de lagos e mares antigos que secaram. Do ponto de vista químico são equivalentes.

I.2.5. Estrutura

A estrutura cristalina do sal encontra-se representada na Figura I-5. É constituída por dois iões unidos por ligações iónicas. O elemento sódio (Na) apresenta-se na forma de um ião positivo (Na^+) por cedência de um electrão ao átomo de cloro (Cl), ficando este carregado negativamente (Cl^-). Esta é a forma mais estável dos elementos envolvidos se associarem, dado que o último nível de electrões de ambos os elementos está completo. A estrutura cristalina do cloreto de sódio resulta assim da atracção mútua exercida pelos iões constituídos por cargas opostas.

O ião sódio desempenha um papel importante em diversas funções do organismo, principalmente no equilíbrio entre os fluidos intra e extra celulares. Actua também na transmissão de impulsos nervosos em todo o corpo, permitindo assim o funcionamento do cérebro e o controlo das funções vitais do Homem [10].

Já o cloro, outro mineral que compõe o sal, também é essencial para uma boa saúde e é fundamental para o processo digestivo. No estômago, é a base para o suco gástrico, que "quebra" e ajuda a digerir os alimentos. Aumenta também a capacidade do sangue de transportar CO_2 das células para o pulmão. Juntos, na forma de sal, sódio e cloreto (cloreto de sódio) estão presentes em todos os tecidos e fluidos do organismo humano, como por exemplo, o suor e as lágrimas [10].

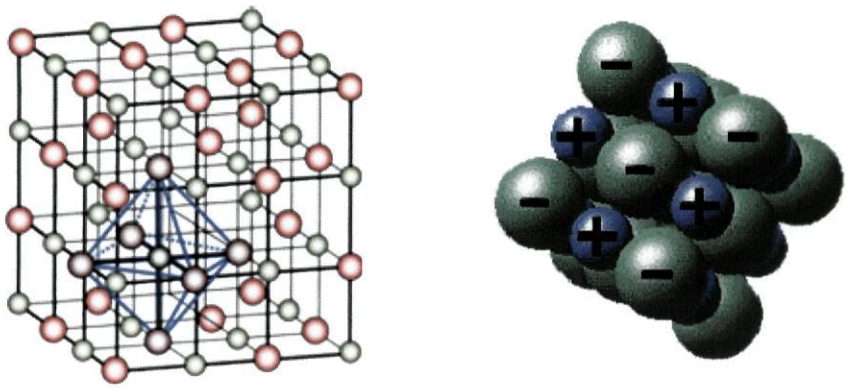


Figura I-5 Estrutura cristalina do NaCl (lado esquerdo) e as cargas e dimensões relativas dos seus iões (lado direito).

I.2.6. Aditivos

Para além dos componentes que são do conhecimento geral do consumidor, farinha de trigo, água, fermento biológico (fermento de padeiro) e sal (cloreto de sódio), podem ser adicionados outros compostos em pequena quantidade. Esta adição deve ter por objectivo melhorar as características da massa durante o processamento e no produto final.

Os aditivos admissíveis no fabrico do pão e produtos afins são os fixados na legislação específica [1] para os géneros alimentícios. No fabrico do pão e produtos afins são proibidos o branqueamento e o uso de branqueadores de farinhas, bem como de levedantes químicos. Em algumas situações pode ser usado vinagre alimentar como auxiliar tecnológico.

Para o fabrico de pão especial é permitida a utilização dos seguintes ingredientes:

a) leite inteiro, desnatado ou magro, pasteurizado, ultrapasteurizado, esterilizado, concentrado, condensado ou em pó, leitelho e soro de leite;

b) manteiga;

c) gordura e óleos comestíveis, margarinas e shortenings;

d) ovos, em natureza ou desidratados;

e) preparados e enchidos de carne;

f) gérmen de trigo;

g) sêmea e sêmola de trigo, de centeio ou de milho;

h) flocos de cereais;

i) sementes comestíveis, em natureza;

j) farinha de leguminosa ou mandioca;

l) fruta, em natureza, seca ou cristalizada, escorrida ou em calda;

m) alho, cebola ou tomate;

n) especiarias, em natureza;

o) e mel.

A menção destes ingredientes deve estar disponível para o consumidor final e para usos industriais e deve obedecer à Portaria n.º 833/89, de 22 de Setembro [12].

I.3. EFEITOS NA SAÚDE

Preocupados com a saúde pública, um grupo de investigadores tentou identificar os componentes na dieta que mais influenciam a saúde, ao nível europeu [13]. Os componentes estudados foram em número limitado, relevantes para a saúde na Europa e possíveis de implementar em todos os países envolvidos, no que diz respeito à recolha e à comparação dos dados. Os indicadores de dieta seleccionados foram, entre outros e por ordem de prioridade, vegetais, fruta, pão, peixe,... . Os biomarcadores considerados incluíam nutrientes como o folato, a vitamina D, o ferro, o iodo e o sódio.

Confirma-se a importância do pão na dieta alimentar, desde que, e tal como referido no ponto I deste seminário, a alimentação seja o mais diversificada e equilibrada possível. Qualquer consumo exagerado de um dado produto poderá originar desequilíbrios orgânicos e conduzir à doença.

Com relação ao pão, a literatura foca dois aspectos em particular: i) o consumo de pão propriamente dito; ii) e a ingestão de sal decorrente do consumo de pão.

I.3.1. Consumo de Pão

De acordo com um estudo do Instituto Farmacológico de Milão, pessoas com o hábito de ingerir muito pão possuem um maior risco de desenvolver cancro dos rins em virtude do elevado teor de glucose fornecido por este alimento [13]. Esta conclusão decorre de um estudo de comparação do estilo de vida, historial médico e hábitos alimentares de 767 adultos portadores do cancro dos rins com outros 767 que não tinham a doença. Neste sentido, seriam necessários mais estudos para comprovar e estabelecer uma relação causa-efeito credível.

Num relatório recente da Organização Mundial de Saúde afirma-se que os hidratos de carbono complexos do pão reduzem os níveis de colesterol no sangue e ajudam a controlar a diabetes.

I.3.2. Consumo de Sal

Na maioria das vezes o consumidor associa o teor de sal nos alimentos ao acto de lhes acrescentar sal aquando da sua preparação. Efectivamente, é importante calcular a quantidade de sal adicionado aos alimentos quando do processamento culinário ou à mesa,

mas é igualmente importante contabilizar o sal contido nos alimentos processados.

A percepção da ingestão de sal por parte dos consumidores não é muitas vezes a mais exacta. Alguns dos alimentos salgados são facilmente identificáveis como tal pelo consumidor, mas outros não (Tabela I-1).

Tabela I-1 Teor de sal em alimentos, associado à percepção do consumidor

Alimentos obviamente salgados	**Alimentos salgados mas que o consumidor não identifica imediatamente**	**Alimentos em relação aos quais algumas marcas/receitas têm um teor elevado em sal**
Anchovas Aperitivos salgados Batatas fritas em palitos (em caso de adição de sal) Oleaginosas tostadas e salgadas (pevides, sementes de girassol) Batatas fritas de pacote Peixe salgado (p. ex. o bacalhau) Enchidos e fumados Azeitonas Carne e peixe fumados	Bacon Pickles Extracto de levedura (suplemento alimentar) Queijos Molho de soja Salsichas Caldo em cubos	Enlatados de vegetais e leguminosas (aos quais foi adicionado sal) Bolachas e biscoitos (tanto doces como salgados) Molhos para cozinhar e temperar Cereais de pequeno-almoço / Refeições pré-cozinhadas Pizza

Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), os consumos médios diários de sódio das populações da Europa variam entre 3-5 g (cerca de 8-11 g de sal) [14], valores significativamente superiores às doses recomendadas (cerca de 1,5 g de sódio/dia em adultos, equivalente a 3,8 g de sal). A tabela I-1 apresenta os teores de sal e sódio de alguns alimentos.

Tabela I-2 Produtos alimentares com teores de sal elevados.

Alimentos	*Sódio* (mg/100g)*	*Sal** (mg/100g)*	*Alimentos*	*Sódio* (mg/100g)*	*Sal** (mg/100g)*
Salpicão	3489	8897	Maionese	568	1448
Presunto	2570	6554	Pizza	533	1359
Fiambre	1371	3496	Pão integral	527	1344
Mortadela	1246	3177	Hambúrguer tipo MacDonald's, c/pão	527	1344
Ketchup	1186	3024	Empada de galinha	524	1336
Salsicha tipo Frankfurt	1120	2856	Pão de forma /regueifa	504	1285
Margarina culinária com sal	1064	2713	Pastéis de bacalhau	471	1201
Corn flakes	1064	2713	Polvo cozido /grelhado	460	1173
Queijo flamengo/Serra	965	2461	Bolo de amêndoa	430	1096
Farinheira	963	2456	Almôndegas	428	1091
Cereais All bran	918	2341	Bacalhau demolhado, cozido	400	1020
Manteiga, com sal	826	2106	Queque/bolo arroz	400	1020
Lanche	822	2096	Atum em conserva, lata	396	1010
Bolachas Cream Cracker	795	2027	Pão de milho (broa)	371	946
Molho Bechamel	776	1979	Mexilhão	369	941
Croissant	744	1897	Bolachas manteiga/Belgas	351	895
Bacalhau recheado	732	1867	Bolacha Maria	350	892
Francesinha com molho	676	1724	Hambúrg. duplo MacDonald's c/ pão	345	880
Alheira de Mirandela ou frita	667	1701	Pastel de nata	341	870
Bolacha integral	659	1680	Lasanha de carne, caseira	304	775
Rissóis/chamuça	641	1634	Queijo creme	296	775
Croquetes de carne	641	1634	Requeijão	295	752
Folhado de carne	612	1561	Pataniscas de bacalhau	288	734
Batatas fritas de pacote	594	1515	Camarão, cozido	224	571
Pão de trigo, tipo corrente	580	1479			

* Quantidade de sódio (mg) por 100 g de produto edível; ** Quantidade de sal estimada (mg) = quantidade de sódio (mg) x 2,55.

De uma forma geral, as crianças muito pequenas devem habituar-se a uma alimentação com pouco ou nenhum sal. No caso dos bebés até um ano não se deve acrescentar sal aos alimentos. Para as restantes crianças, a quantidade máxima a ingerir depende do peso, podendo ser referido cerca de 2 g por dia até aos dois anos; 3 g até aos 6 anos; e 5 g até aos dez anos. Mesmo dentro destes valores, quanto menos se ingerir, melhor. A habituação ao sabor dos alimentos com pouco sal é a garantia de reduzir substancialmente o problema do excesso do seu consumo. Os adultos não devem consumir mais de 5g por dia (1 colher de chá cheia). Esta é a quantidade total de sal a ingerir, incluindo o sal que faz parte dos alimentos.

O consumo excessivo e/ou regular de sal pode contribuir para alguns desequilíbrios orgânicos (Tabela I-3) capazes, ou não, de promover doença grave. Os mais referidos na literatura reportam a hipertensão e o cancro do estômago.

Tabela I-3 Efeitos da ingestão moderada e excessiva de sal.

Efeitos genéricos do consumo de sal	
Moderado	***Excesso***
Enérgico e vital; Purificador, pois ajuda o organismo a eliminar toxinas; Torna os alimentos mais nutritivos e substanciais; Ajuda a digestão, contribuindo para a secreção de ácidos no estômago; Estimula a função renal; Promove a absorção de cálcio e a utilização de nutrientes em geral, se ingerido em quantidades moderadas; Desempenha um papel importante em determinadas funções fisiológicas; Ajuda a produção de bílis, o que torna possível a assimilação de gordura nos intestinos; Aumenta os movimentos peristálticos do intestino, contribuindo para uma boa digestão; Alcaliniza o sangue; O sódio ajuda a condução dos impulsos nervosos e contribui para uma melhor contracção muscular.	Afecta os rins; Interfere com o metabolismo de absorção do cálcio e outros nutrientes; Retenção de líquidos; Aumento da pressão arterial – hipertensão.

I.3.2.1 Hipertensão

A ingestão de teores elevados de NaCl contribui para o aumento da pressão arterial. Observações epidemiológicas e clínicas, associadas a estudos em animais, sugerem que as dietas ricas em NaCl podem ter, também, consequências cardiovasculares [15].

Estudos efectuados em chimpanzés confirmam que a adição de NaCl à dieta (tipicamente constituída por frutas e vegetais de baixo teor em sódio) origina um aumento significativo da pressão arterial [16]. Este aumento é dependente da concentração de NaCl.

Também em seres humanos foi evidenciada uma associação entre a ingestão de NaCl e a pressão arterial [17-21]. De um modo geral, a pressão arterial diminui com a diminuição da quantidade de NaCl e/ou aumenta com o aumento da quantidade do sal [22,23]. O efeito do NaCl sobre a pressão arterial depende, contudo, da idade e da história familiar de hipertensão [24].

Os diversos modelos experimentais de hipertensão e uma informação cada vez mais vasta sobre o ser humano, evidenciam a susceptibilidade genética e a resistência genética aos efeitos do NaCl na dieta sobre a pressão arterial. Por exemplo, evidências experimentais e clínicas sugerem que uma capacidade diminuída, geneticamente determinada de excretar sódio, contribui para elevações da pressão arterial induzidas pelo NaCl no hospedeiro susceptível [25]. O organismo precisa de mais líquido para equilibrar a concentração de sódio no sangue, levando a que os rins retirem menos líquidos do organismo e, consequentemente, diminuam a excreção de urina. Dessa forma, o coração é forçado a bombear com mais força para manter um volume maior de líquido em circulação, aumentando, assim, a pressão arterial.

De uma forma geral, é possível identificar diversos mecanismos inter-relacionados de controlo da pressão arterial que podem contribuir para elevações da pressão arterial induzidas pelo NaCl (Figura I-6).

A restrição, moderada e de curta duração, de NaCl na dieta origina um decréscimo pouco significativo na pressão arterial de indivíduos normotensos [26,27]. Estas reduções modestas pareceram questionar as recomendações de redução da ingestão de NaCl na população em geral [28], embora os ensaios efectuados tenham durado menos de 2 semanas. De um ponto de vista estatístico, essas pequenas reduções da pressão arterial na população reduziriam os riscos de acidentes vasculares cerebrais em 15% e de cardiopatia coronária em 6% [29].

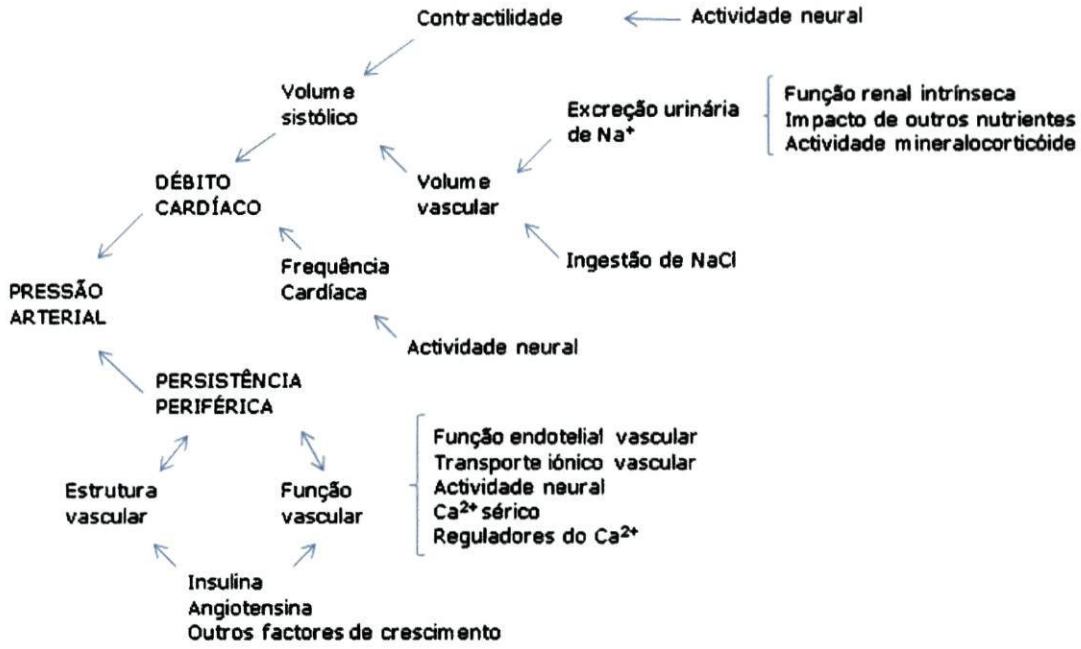


Figura I-6 Factores fisiológicos inter-relacionados que contribuem para a regulação da pressão arterial.

Embora o sódio seja o mineral mais directamente relacionado com a hipertensão, sabe-se hoje que outros minerais podem também interferir nos níveis de pressão. Estão incluídos aqui o cálcio e o cloreto.

As respostas da pressão arterial ao sódio podem ser modificadas por outros componentes da dieta. Evidências epidemiológicas e clínicas sugerem que a ingestão de potássio ou cálcio, abaixo das doses diárias recomendadas, potencializa a sensibilidade da pressão arterial ao NaCl [30,31]. Em contraposição, a alta ingestão de potássio ou de cálcio previne ou atenua o desenvolvimento de hipertensão induzida pelo NaCl, em diversos modelos animais.

O cloreto, enquanto anião que acompanha o sódio, é importante na determinação da magnitude do aumento da pressão arterial, em resposta a uma ingestão elevada de NaCl. A expressão completa da hipertensão *NaCl-sensível* depende da administração de ambos, sódio e cloreto [32]. Tanto em modelos experimentais de hipertensão *NaCl-sensível*, quanto no humano, a pressão arterial não é aumentada por ingestão elevada de sódio com outros aniões que não o cloreto. Uma ingestão elevada de cloreto, sem sódio, tem menos efeito sobre a pressão arterial do que o NaCl. A incapacidade dos sais de sódio não-cloretos de produzir hipertensão pode estar relacionada à sua incapacidade de expandir o volume plasmático. Nas dietas usuais, no entanto, o sódio é geralmente consumido sob a forma de NaCl.

I.3.2.2 Risco de cancro gástrico

O cancro gástrico era, em 2000, a segunda causa mais frequente de morte por cancro e o quarto cancro mais comum a nível mundial. Há um número estimado de 650 000 mortes e 880 000 novos casos por ano, quase dois terços dos mesmos em países em vias de desenvolvimento [33].

Há evidências que sugerem fortemente que o risco de cancro pode aumentar com uma ingestão elevada de alguns alimentos tradicionais conservados em sal, e do próprio sal, e que esse risco pode ser reduzido aumentando o consumo de fruta e vegetais [34,35]. A ingestão de alimentos salgados pode aumentar o risco de infecção por *Helicobacter pylori* e ter uma acção sinérgica, no desenvolvimento de cancro gástrico.

Estudos experimentais conduzidos em ratos demonstraram que a ingestão de sal causa gastrite e que, quando co-administrada, aumenta os efeitos cancerígenos de agentes conhecidos tal como a N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) [36,37]. Uma concentração intragástrica elevada de sal destrói a barreira da mucosa e provoca inflamação e danos, como erosão difusa e degeneração. A alteração proliferativa induzida poderá aumentar o efeito dos agentes cancerígenos derivados dos alimentos.

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria que coloniza a mucosa gástrica humana. As suas células bacterianas têm a forma de bastonetes curvos, espiralados, ou uma morfologia cocóide no caso de culturas prolongadas. Apresentam 4 a 6 flagelos unipolares essenciais para a sua mobilidade. Estes microrganismos são Gram-negativo e crescem em ambiente microaerófilo, a temperaturas entre os 30ºC e os 37ºC. A infecção por *H. pylori* é considerada como a infecção crónica humana mais prevalente no mundo. Nos países em desenvolvimento, a *H. pylori* infecta 70% a 90% da população e nos países desenvolvidos a prevalência é menor (entre 25% e 50%). Apesar destas observações, o modo de transmissão da infecção não está ainda bem esclarecido, tendo sido descritas três possíveis vias de contaminação: fecal-oral, oral-oral e, menos frequentemente, iatrogénica.

A infecção por *H. pylori* está associada a vários quadros clínico-patológicos como gastrite crónica, úlcera péptica (gástrica e duodenal) e carcinoma gástrico. Apesar de ser um factor de risco estabelecido, não é causa suficiente para o desenvolvimento de cancro gástrico [38,39]. Assim, a infecção por *H. pylori* não pode ser confundida no estabelecimento de uma ligação causal entre o consumo de sal e de alimentos salgados e o cancro gástrico. A restrição do consumo de sal e de alimentos salgados pode, pelo menos, reduzir o risco de cancro gástrico.

I.3.2.3 Estratégias para Reduzir o Consumo de Sal

O hábito de cozinhar em casa, em Portugal, facilita o controlo da quantidade de sal a incluir nas refeições. De uma forma geral, a confecção dos alimentos deve ser feita com pouco ou nenhum sal, optando por métodos que valorizem o paladar natural dos alimentos. Algumas estratégias práticas para cozinhar em casa com pouco sal são:

a) temperar com ervas aromáticas, especiarias, sumo de limão, vinho e vinagre;

b) utilizar marinadas e vinha d'alhos, para temperar os alimentos de véspera;

c) combinar alimentos de sabor intenso com outros mais insípidos, por exemplo, incluir cebola, alho, pimento e tomate e tentar cozinhar em pouca água, para concentrar os cheiros e sabores.

d) não adicionar sal aos alimentos quando a refeição inclua molhos pré-preparados, conservas ou produtos de charcutaria;

e) não ter saleiro à mesa;

f) evitar rectificar o sal durante o cozinhado, afastando o saleiro para não o fazer automaticamente.

De acordo com a EFSA, os alimentos processados são responsáveis por 70 a 75% do consumo de sal. Para se reduzir este valor, deve evitar-se o consumo habitual de:

a) pratos/alimentos altamente conservados em sal (pickles, fumados, enchidos);

b) caldos concentrados;

c) produtos à base de carne como rissóis, croquetes, produtos de salsicharia, enchidos, fiambre;

d) conservas de marisco, peixe e carne;

e) bacalhau seco ou salgado;

f) bolachas com sal;

g) molhos preparados industrialmente.

I.3.2.4 Recomendações de consumo de sal

As recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) sugerem um consumo diário de

5 g sal (2 g sódio) para adultos. A *American Heart Association* e o *Committee on Medical Aspects of Food and Nutrition Policy* recomendam um valor ligeiramente superior a 6 g de sal por dia. A *Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, da National Academy of Sciences,* publicou, em 2004, uma listagem detalhada, relacionando os vários estágios do ser humano com o teor de sal recomendado [40].

Tabela I-4 Valores adequados de ingestão diária de sódio e sal.

		Sódio (g/dia)	***NaCl (g/dia)***			***Sódio (g/dia)***	***NaCl (g/dia)***
Bebés	0-6 meses	0,12	0,31	***Grávidas***	14-18 anos	1,5	3,82
	7-12 meses	0,37	0,94		19-30 anos	1,5	3,82
					31-50 anos	1,5	3,82
Crianças	1-3 anos	1,0	2,55	***Lactantes***	14-18 anos	1,5	3,82
	4-8 anos	1,2	3,06		19-30 anos	1,5	3,82
					31-50 anos	1,5	3,82
Homens	9-13 anos	1,5	3,82	***Mulheres***	9-13 anos	1,5	3,82
	14-18 anos	1,5	3,82		14-18 anos	1,5	3,82
	19-30 anos	1,5	3,82		19-30 anos	1,5	3,82
	31-50 anos	1,5	3,82		31-50 anos	1,5	3,82
	51-70 anos	1,3	3,32		51-70 anos	1,3	3,32
	>70 anos	1,2	3,06		>70 anos	1,2	3,06

* Quantidade de sódio (mg) por 100 g de produto edível; ** Quantidade de sal estimada (mg) = quantidade de sódio (mg) x 2,55.

I.4. MONITORIZAÇÃO DA QUALIDADE

Tendo em vista garantir a segurança do consumidor, os produtos alimentares distribuídos no mercado devem estar sujeitos a um controlo rigoroso do ponto de vista físico-químico. As características do pão e dos produtos afins poderão ser fiscalizadas em qualquer fase do seu fabrico, designadamente nas massas panares [1].

I.4.1. Características organolépticas

No caso do pão, este deverá revelar condições de fabrico normais e apresentar características organolépticas próprias [1]. O pão e produtos afins deverão obedecer às características legalmente fixadas, estar isentos de agentes patogénicos, não conter microrganismos ou substâncias deles derivadas, em níveis que possam representar risco para a saúde do consumidor, não se apresentarem conspurcados ou com sinais de parasitação vegetal ou animal, nem conterem substâncias estranhas à sua normal composição.

Na legislação são mencionadas algumas características organolépticas, designadamente aroma, cor, sabor, textura de côdea, alveolado e consistência do miolo [1]. Em termos gerais, as características externas frequentemente avaliadas no pão são: a dimensão do produto, o volume, a aparência, a cor e a formação da côdea. As características internas são a distribuição, o tamanho e o número de alvéolos no miolo, a cor e a textura. Na avaliação sensorial são verificados parâmetros de sabor e aroma [41].

O volume específico (razão entre a massa e o volume) é um parâmetro de qualidade que indica se a fermentação do pão foi excessiva (volume específico muito grande) ou se ocorreram problemas na formação do glúten ou na fermentação (baixo volume específico) [42].

I.4.2. Características analíticas

A legislação fixa para o pão teores máximos de humidade entre os 30 e os 33 % para massas nominais inferiores a 250 g e entre os 33 e 40 % para massas nominais superiores a 250 g [1]. Os teores permitidos dependem do tipo de farinha utilizada no fabrico do pão. Para o pão de trigo preparado com farinha de trigo tipos 55 ou 65 os teores são 30 ou 33 % para massas nominais inferiores ou superiores, a 250 g. Quando o pão de trigo é fabricado com farinha de trigo tipos 80 ou 110, os teores oscilam entre 30 e 38 %. O pão integral de

trigo, o pão de centeio, o pão integral de centeio e o pão de mistura têm valores limite de humidade diferentes, com um valor de 33 % para massas nominais inferiores a 250 g e de 40 % para massas nominais superiores a 250 g.

Os açúcares totais no pão estão também legislados. Esta característica analítica deverá expressar-se em sacarose e é referida a matéria seca [1]. Na generalidade, o valor obtido não poderá exceder 3 %. No caso específico das diversas variedades de pão especial, o valor poderá ser ligeiramente superior, não podendo exceder 5%, e dos produtos afins estabelece-se um limite inferior de 5% e um limite superior de 22%.

I.4.3. Métodos de Análise

Para verificação das características do pão e produtos afins, serão utilizados os métodos de preparação da amostra e de análise definidos na lei [1]. Perante a ausência de legislação específica, deverá a Direcção-Geral de Fiscalização e Controlo da Qualidade Alimentar indicar os métodos a utilizar.

O critério microbiológico a utilizar na apreciação das características dos produtos afins do pão bem como a metodologia para a obtenção e constituição da amostra para laboratório são os definidos na portaria prevista pelo Decreto-Lei n.º 4/90, de 3 de Janeiro, que estende àqueles produtos os mesmos parâmetros mínimos de qualidade que os fixados para os bolos e cremes de pastelaria.

A associação entre o factor saúde e o consumo de pão confere um especial relevo à determinação e monitorização do teor de sal neste produto. São muitos os métodos descritos na literatura para este efeito, descritos em seguida.

I.5. MONITORIZAÇÃO DE NaCl

A monitorização do teor de sal é algo habitualmente associado ao valor de sódio nos alimentos. Os riscos para a saúde são causados principalmente pelo catião sódio, dado que este possui a capacidade de intervir directamente na pressão arterial.

A necessidade da determinação de cloreto nos produtos alimentares, especialmente naqueles em que ocorre adição intencional de cloreto de sódio, é motivada, sobretudo, por exigências do controlo de produção, assim como exigências de garantir alimentos saudáveis. Do ponto de vista medicinal, parecem não existir problemas sérios causados por cloretos por serem relativamente bem excretados pelo organismo. No entanto, são necessários, pois desempenham um papel importante, juntamente com o sódio, na manutenção da pressão osmótica e no equilíbrio ácido-base do ambiente interno de um organismo [43]. Apesar da importância do sódio, o avanço científico parece conferir uma grande importância ao anião cloreto que o acompanha no sal.

I.5.1. Catião Sódio(Na^+)

Na sequência da relevância analítica que se lhe tem atribuído, as determinações de sódio podem ser efectuadas de formas muito diversas, desde os métodos ópticos, aos separativos e aos electroanalíticos. Entre todas as determinações encontradas na literatura, as baseadas em fotometria de chama, em cromatografia iónica e em potenciometria são, talvez, as de maior incidência nos laboratórios de rotina.

A fotometria de chama é especialmente aplicada a elementos dos primeiro e segundo grupos da tabela periódica. Estes elementos apresentam baixas energias de ionização pelo que são passíveis de elevar os seus electrões a níveis mais excitados, quando a temperatura da chama ainda não é muito elevada. O retorno desses electrões ao estado fundamental fornece a radiação que atinge o detector com fins analíticos. Dado que o número de elementos que efectivamente emitem radiação é muito reduzido, torna-se necessária uma manutenção rigorosa das condições experimentais. Sendo uma técnica simples, acarreta, naturalmente, os riscos e os custos associados ao manuseamento de gases comprimidos.

I.5.2. Anião Cloreto(Cl^-)

A determinação do anião cloreto nos alimentos é ainda uma tarefa analítica muito requisitada. A análise de alimentos [44, 45] e bebidas [46, 47] é de grande importância, mas o solo também o é, devido à potencial toxicidade deste ião para algumas plantas e também porque conduz a um aumento da pressão osmótica em redor das suas raízes, o que reduz drasticamente a absorção de água [48]. Na indústria, existem também muitas aplicações onde a determinação do teor de cloretos é crucial [49, 50].

Em laboratórios químicos, as técnicas clássicas baseadas em volumetrias são, ainda, utilizadas com frequência. Para além destas existem outros métodos instrumentais, habitualmente mais robustos e capazes de fornecer respostas mais rápidas, mais selectivas e mais reprodutíveis.

I.5.3. Métodos Clássicos

Os métodos clássicos para a determinação de cloreto são volumetrias que envolvem a precipitação do anião cloreto com um catião apropriado. Os mais comuns são os métodos de Mohr, Charpantier-Volhard e Fajans, todos eles argentometrias.

Estes métodos utilizam soluções de Nitrato de prata ($AgNO_3$) com elevado grau de pureza que constitui um bom padrão primário. No entanto, porque é demasiado caro, é muitas vezes utilizado com um baixo grau de pureza, para padronização posterior com cloreto de sódio primário. É preciso ter alguns cuidados com o $AgNO_3$ sólido e as suas soluções nomeadamente, protecção do contacto com poeiras, matéria orgânica e luz. Devem ser manipulados com luvas e guardados em frascos de vidro escuro.

Quando os métodos utilizam tiocianatos, de potássio ou de amónio, é necessário a preparação de soluções de concentração aproximada para posterior titulação com solução de prata usando o método Charpantier-Volhard. Estes sólidos não são substâncias primárias, são higroscópicos e difíceis de secar, sem que ocorra decomposição. Com relação ao armazenamento das suas soluções não são necessários cuidados especiais.

O método de Mohr é uma volumetria directa aplicável no doseamento de iões cloreto e brometo (X^-), ocorrendo a formação de cloreto de prata AgCl (precipitado branco), ou de brometo de prata AgBr (precipitado amarelado), segundo a equação seguinte:

$$Ag^+_{(aq)} + X^-_{(aq)} \rightarrow AgX_{(s)}$$

O ponto final da titulação é indicado pela formação de cromato de prata (precipitado vermelho) segundo a equação:

$$2\ Ag^+_{(aq)} + CrO_4^{2-}{}_{(aq)} \rightarrow Ag_2CrO_{4\ (s)}$$

Este último precipitado forma-se imediatamente a seguir à precipitação completa do halogeneto e é notado pela sua cor nitidamente diferente do precipitado resultante dos halogenetos de prata. A formação do cromato de prata não pode acontecer antes do ponto de equivalência e deve ocorrer na proximidade do ponto de equivalência. Estas condições estão garantidas porque a solubilidade do cloreto de prata é inferior à solubilidade do cromato de prata.

O método de Mohr é limitado ao intervalo de pH entre 6,5 e 10. Quando o pH é superior a 10 forma-se hidróxido de prata (precipitado branco) e óxido de prata (precipitado negro) através das equações:

$$Ag^+_{(aq)} + OH^-_{(aq)} \rightarrow AgOH_{(s)}$$

$$2\ AgOH_{(aq)} \rightarrow Ag_2O_{(s)} + H_2O$$

Quando o pH é inferior a 6,5 ocorre a dismutação do cromato a dicromato segundo a equação:

$2\ CrO_4^{2-} + 2H^+ (aq) \rightarrow Cr_2O_7^{2-} (aq) + H_2O$

Nestas circunstâncias ocorreria um uso excessivo de Ag (I) para que a formação de Ag_2CrO_4 ocorresse em quantidade detectável a olho nu.

Genericamente, a utilização do anião cromato como indicador limita a aplicabilidade do método de Mohr no que diz respeito:

- à presença de catiões que precipitem o anião cromato;
- ao ajuste de acidez imposto pela presença de CrO_4^{2-} pois pode originar a precipitação de hidroxi-halogenetos ou oxi-halogenetos de catiões pesados;
- à não detecção visual de cromato de prata quando em pequenas quantidades;
- e à presença de espécies coradas para a detecção visual do ponto final.

I.5.4.1 Método de Charpantier-Volhard

Este método é uma volumetria de retorno aplicável ao doseamento de iões cloreto, brometo e iodeto (X^-). Tal como no método anterior, consiste na precipitação completa do halogeneto com o catião prata. Porém, a prata é adicionada em excesso e numa quantidade rigorosa. A quantidade de halogeneto na amostra é deduzida a partir da quantidade de prata que permaneceu por reagir. Para isso, procede-se à sua titulação com o anião tiocianato, com formação de um precipitado branco, de acordo com a equação:

$Ag^+ (aq) + SCN^- (aq) \leftrightarrow AgSCN (s)$

Logo após ter precipitado todo o catião prata, o tiocianato reage com o indicador Fe^{3+}, que forma, após o ponto de equivalência, o complexo seguinte:

$Fe^{3+} (aq) + SCN^- (aq) \leftrightarrow [Fe(SCN)]^{2+} (aq)$

Este complexo é solúvel e apresenta uma cor vermelha-alaranjada intensa. A constante de formação do complexo $[Fe(SCN)]^{2+}$ é tal que este só se forma após a precipitação do tiocianato de prata. Estas propriedades permitem a sua utilização na detecção do ponto final da titulação.

A aplicação desta titulação requer, porém, algumas condições específicas, como:

- pH ácido (pH ≤ 3) para evitar a hidrólise do Fe^{3+}, com consequente precipitação de hidróxidos de ferro ou de hidroxi-sais de ferro; o meio ácido evita a interferência de aniões como o arsenito, fosfato, oxalato, sulfito, sulfureto e carbonato que precipitam o catião prata em meio alcalino.
- a adição de um excesso de prata, provoca a adsorção deste catião pelo precipitado (AgCl) o que origina o aparecimento de um excesso de SCN^- ocorrendo o ponto final prematuramente; este problema pode ser resolvido agitando energicamente a solução até que a cor laranja seja persistente.
- não podem estar presentes iões corados em elevadas concentrações porque podem mascarar a cor do complexo;
- não devem estar presentes, em solução, iões que possam reagir com o tiocianato (Hg^{2+}, com formação de tiocianato de mercúrio);
- no doseamento do anião cloreto existe o risco do tiocianato deslocar parte do cloreto do precipitado ($AgCl + SCN^- \leftrightarrow AgSCN + Cl^-$).; esta limitação pode ser colmatada pela adição de nitrobenzeno que recobre as partículas do precipitado evitando a acção do anião tiocianato.

A utilização de um meio fortemente ácido apresenta a vantagem de evitar a interferência de aniões que precipitam o catião prata.

I.5.4.2 Método de Fajans

O método de Fajans é uma volumetria aplicável ao doseamento de halogenetos (cloreto, brometo e iodeto) (X^-) e do tiocianato. Tal como no método anterior, consiste na precipitação completa do halogeneto com o catião prata. O ponto final da titulação é indicado por indicadores de adsorção. Estes são corantes orgânicos (aniónicos ou catiónicos) que adsorvem à superfície dos precipitados, conferindo-lhes uma cor à superfície. Estes indicadores não podem ser usados em amostras com sólidos suspensos, em virtude da forte adsorção à superfície de precipitados, competindo com aniões para a camada de adsorção primária.

I.5.5. Métodos Instrumentais

Para além dos métodos clássicos, existem múltiplos métodos instrumentais dedicados à determinação de cloretos em alimentos. Estes métodos são baseados em técnicas diversas, nomeadamente as de natureza óptica, separativa ou electroanalítica.

De uma forma geral, de entre os vários métodos descritos na literatura, podem ainda

distinguir-se os mais convencionais e os mais automáticos. Consideram-se como convencionais aqueles que efectuam ensaios em condições de estado estacionário. São medidas habitualmente sensíveis e com baixos limites de detecção. A sua grande limitação prende-se com o reduzido número de amostras passíveis de análise, por unidade de tempo. Os mais automáticos são mais adequados à implementação de análises de rotina requeridas pelo controlo de qualidade em indústrias alimentares e estão associados a leituras de soluções em movimento por recurso a técnicas de fluxo.

Uma pesquisa na base de dados da *ISI Web of Knowledge* indica que a técnica de fluxo mais utilizada pelos investigadores é a Análise por Injecção em Fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*), com aproximadamente 33 % dos trabalhos publicados no domínio da análise de cloretos em alimentos. Os sistemas de Análise por Injecção Sequencial (SIA, do inglês *Sequential Injection Analysis*) são os segundos mais utilizados neste domínio.

A metodologia FIA é genericamente baseada na intercalação de pequenos volumes de amostra, rigorosamente medidos, num fluido transportador que os arrasta ao longo do sistema. Durante este processo, podem ocorrer interacções entre ambos, que vão desde uma simples diluição às reacções químicas mais complexas. Desde a sua implementação, com Ruzicka e Hansen, 1975, a metodologia FIA tem evoluído no sentido de estabelecer sistemas que permitam efectuar alguns procedimentos complexos no interior da montagem [51]. Um exemplo desta situação é a extracção líquido-líquido, conseguida habitualmente através de reactores de extracção e de membranas de separação de fases, colocados ao longo da montagem. Este procedimento é mais rápido e reprodutível que o ensaio discreto correspondente e elimina o contacto directo do operador com solventes tóxicos. Estes sistemas permitem também processos de diálise, de diluição, de concentração, etc., e, se a detecção não for destrutiva, permite ainda análises multi-paramétricas.

Genericamente, os métodos baseados em sistemas FIA são métodos mais rápidos do que os sistemas cromatográficos, que curiosamente foram a essência do aparecimento da metodologia FIA. Outras vantagens destas metodologias prendem-se com elevadas frequências analíticas (FA) e reprodutibilidades de sinal com reduzidos consumos de amostra e de reagentes. Em consequência da elevada frequência analítica, os equipamentos não representam um custo substancial para o laboratório e a emissão de efluentes tóxicos é reduzida de forma significativa. Além disso, a intervenção do operador encontra-se francamente reduzida, o que contribui para uma menor exposição a compostos com elevada toxicidade.

Os sistemas SIA não recorrem a um fluxo contínuo mas sim um fluxo bidireccional, permitindo propulsar e aspirar as soluções mergulhadas em canais periféricos para uma válvula central. Estes sistemas são, em termos ambientais e económicos, mais vantajosos

que os sistemas FIA, já que o consumo de reagentes e a emissão de resíduos são francamente reduzidos. Porém, uma simples mistura de soluções no interior do sistema pode ser complexa e requerer a utilização de acessórios adicionais.

Genericamente, a elevada versatilidade dos sistemas de fluxo permite a sua interface com grande parte dos detectores disponíveis actualmente. Isto explica a presença na literatura de métodos ópticos, métodos separativos e métodos electroanalíticos associados a técnicas de fluxo para a determinação de cloretos em alimentos.

Os métodos mais utilizados para esta determinação, podendo processar-se em condições de estado estacionário ou fluxo, baseiam-se em técnicas electroanalíticas (Figura I-7).

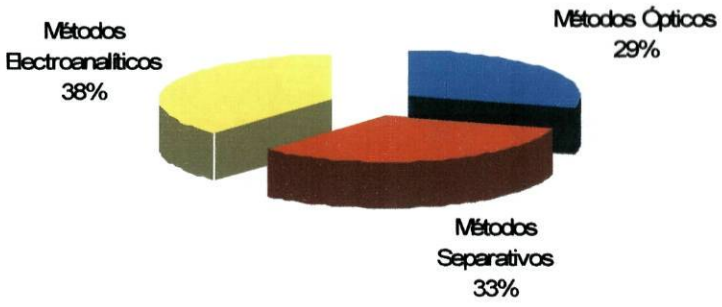


Figura I-7 Distribuição percentual da aplicação dos vários métodos instrumentais na determinação de cloretos

Nos capítulos seguintes apresenta-se um resumo dos trabalhos encontrados na literatura para a determinação de cloretos em alimentos baseada em sistemas de fluxo. Numa fase posterior será proposto um método alternativo para este efeito. O método será aplicado à análise de amostras reais.

I.6. MÉTODOS ÓPTICOS

Os métodos ópticos recorrem à interacção entre a matéria e a radiação electromagnética, em toda a gama do espectro, desde os raios X até às microondas [52]. Os métodos ópticos são, por isso, baseados em fenómenos de óptica clássica. De um modo geral, classificam-se de acordo com a natureza da interacção em curso [52], nomeadamente absorção, emissão, difracção, refracção, dispersão, reflexão e polarização. Genericamente, os métodos ópticos utilizados para a quantificação de cloretos baseiam-se na Espectrofotometria de absorção UV/VIS.

Entre os vários métodos ópticos descritos destacam-se os baseados em espectrofotometria de absorção/emissão na região do UV/VIS (Tabela I-5). Genericamente envolvem procedimentos simples, rápidos e de baixo custo e baseiam-se na determinação indirecta de cloretos. Para além disso, requerem tratamentos de amostra de maior ou menor complexidade, que podem ser efectuados em linha, quando executados em sistemas de fluxo. Dos trabalhos publicados encontram-se artigos com a descrição da determinação de cloretos por técnicas de fluxo em amostras de águas [53,54,59], cigarros [55,56], leite [57], sumos de fruta [58], carnes curadas [60] e formulações farmacêuticas [61].

A estratégia utilizada para as determinações de cloreto por FIA representam, no fundo, uma adaptação dos métodos clássicos a condições de fluxo. Numa das determinações o cloreto reage com a prata para formar de cloreto de prata [53]. Dada a possibilidade de oclusão dos tubos dos sistemas de fluxo pelo precipitado, há a preocupação de obter um composto solúvel a partir do cloreto de prata. Para isso, está presente um excesso de amoníaco originando $Ag(NH_3)_2^+$.

Todos os outros trabalhos publicados têm por base a reacção do cloreto com o $Hg(SCN)_2$ [54-58]. Desta reacção decorre a libertação de iões tiocianato e formação posterior de um complexo corado com Fe^{3+}. Um dos métodos inclui o tiocianato de mercúrio [54] num reactor em fase sólida, o que contribui para a redução do impacte ambiental desta determinação.

O consumo de amostra nas determinações por FIA é reduzido, injectando-se entre 26 e 500 µL por determinação. Naturalmente, a diluição exercida sobre a alíquota de amostra injectada, ao longo do próprio sistema, vai condicionar os diversos parâmetros analíticos do método, com grande incidência nos limites de detecção e intervalos de linearidade. Os métodos com volumes de injecção até 50 µL registam os comportamentos lineares para valores mais altos de concentração enquanto que aqueles que utilizam entre 100 e 500 µL de amostra permitem ensaios a concentrações inferiores (Tabela I-5).

As determinações em FIA são expeditas, permitindo a análise de 60 a 100 amostras por hora [53-57]. Apenas uma referência indica um valor mais reduzido de 25 determinações por hora [58]. Este valor reduzido resulta porém da inclusão em-linha de uma membrana de diálise. As membranas de diálise permitem a exclusão de algumas espécies interferentes no percurso que leva a amostra até ao detector. Esta necessidade era previsível já que a transposição dos métodos clássicos para sistemas em linha não garante a eliminação de todas as interferências já aí descritas.

Em relação às determinações por SIA pode constatar-se na Tabela I 6 que a frequência amostral varia entre 30 [60] e 60 [61] amostras analisadas por hora, o intervalo de linearidade é extenso, uma vez que é possível uma variação de 0 [59] a 1000 [60] mg/L quando a determinação de cloretos é feita indirectamente pela sua reacção com $Hg(SCN)_2$, sendo razoavelmente menor quando se utiliza um sensor óptico [61]. O volume de injecção é muito variável.

Comparando genericamente os métodos ópticos desenvolvidos segundo a técnica de fluxo, os de FIA parecem ser os mais adequados para as análises de rotina em alimentos, pois permitem obter ritmos de amostragem mais elevados. Por outro lado, estes ritmos de amostragem estão habitualmente associados à emissão de um grande volume de resíduos laboratoriais, o que se pode tornar numa limitação de natureza económica e ambiental.

Para os métodos de fluxo descritos na literatura esperam-se as mesmas interferências indicadas para os métodos clássicos, por se basearem nas mesmas reacções. Porém, porque as reacções têm lugar em fluxo, a intensidade de cada interferência deve ser menor do que a encontrada em condições de estado estacionário. Esta característica decorre do reduzido tempo de reacção quando os ensaios decorrem em fluxo, ocorrendo habitualmente uma discriminação cinética que favorece a reacção do analito.

Apesar dos sistemas em fluxo permitirem ultrapassar algumas limitações associadas aos sistemas convencionais, o recurso a técnicas baseadas em radiações electromagnéticas deixa antever, mesmo assim, algumas dificuldades analíticas, inerentes à coloração, turvação ou índice de refracção das amostras [52]. Neste sentido, outros autores optam pelas técnicas separativas, visando separar o analito da matriz da amostra antes de efectuar a sua quantificação.

Tabela I-5 Determinação de cloretos por FIA com detecção UV/VIS

Amostra	Descrição	Características do método						
		λ (nm)	LD (mg L^{-1})	IL (mg L^{-1})	VI (µL)	Fluxo (ml min^{-1})	FA (amostras h^{-1})	[REF] Ano
Água	Reacção de AgCl com excesso de NH_3. $AgCl + 2NH_3 \Leftrightarrow Ag(NH_3)_2^+ + Cl^-$ AgCl forma um precipitado que, após passagem por uma célula apropriada, é dissolvido pelo excesso de NH_3 que circula no sistema.	500	n.a	3 - 30	100	2	60	[53] 2002
Águas Naturais	O cloreto reage com $Hg(SCN)_2$, imobilizado numa resina epoxídica de um reactor de fase sólida. $Hg(SCN)_2 + 2Cl^- \Leftrightarrow HgCl_2 + 2SCN^-$ Os iões livres de tiocianato são determinados posteriormente por formação de um complexo corado com Fe(III) $SCN^- + Fe^{3+} \rightarrow [Fe(SCN)]^{2+}$	480	0,50	2,0 - 7,8	500	5,5	100	[54] 2005
Cigarros		454	0,30	0,3 - 25	500	0,60	n.a	[55] 1998
Cigarros	Determinação indirecta de cloretos pela sua reacção com $Hg(SCN)_2$, $Hg(SCN)_2 + 2Cl^- \Leftrightarrow HgCl_2 + 2SCN^-$, baseada na formação de um complexo corado, vermelho de tiocianato de ferro(III), $SCN^- + Fe^{3+} \rightarrow [Fe(SCN)]^{2+}$	480	0,02	0 - 7,5	200	0,70	60	[56] 2001
Leite		480	n.a	500 - 2500	50	2,5	80	[57] 1999
Sumos de Fruta		480	n.a	20 - 250	26	0,6	25	[58] 1997

λ: Comprimento de onda; LD: Limite Detecção; IL: Intervalo Linearidade; VI: Volume de Injecção; FA: Frequência Analítica; REF: Referências Bibliográficas; n.a: não aplicável.

Tabela I-6 Determinação de cloretos por SIA com detecção UV/VIS

Amostra	Descrição	Características do método						[REF] Ano
		λ (nm)	LD (mg L^{-1})	IL (mg L^{-1})	VI (µL)	Fluxo (ml min^{-1})	FA (amostras h^{-1})	
Águas Minerais e engarrafadas	Determinação indirecta de cloretos pela sua reacção com $Hg(SCN)_2$, $Hg(SCN)_2 + 2Cl^- \Leftrightarrow HgCl_2 + 2SCN^-$, baseada na formação de um complexo corado, vermelho de tiocianato de ferro(III), $SCN^- + Fe^{3+} \rightarrow [Fe(SCN)]^{2+}$ A água desionisada é o fluxo transportador	480	3,01	0 – 50	320	3,21	37	[59] 2001
Carnes curadas	Determinação indirecta de cloretos pela sua reacção com $Hg(SCN)_2$, $Hg(SCN)_2 + 2Cl^- \Leftrightarrow HgCl_2 + 2SCN^-$, baseada na formação de um complexo corado, vermelho de tiocianato de ferro(III), $SCN^- + Fe^{3+} \rightarrow [Fe(SCN)]^{2+}$	480	n.a	5 – 1000	10	1,1	30	[60] 1998
Formulações farmacêuticas	Sensor óptico com Indium, PVC, bis-(2-etil-hexil)sebacato e um derivado da fluoresceína	530	n.a	0,35 – 345,5	650	6	60	[61] 2004

λ: Comprimento de onda; LD: Limite Detecção; IL: Intervalo Linearidade; VI: Volume de Injecção; FA: Frequência Analítica; REF: Referências Bibliográficas; n.a: não aplicável.

I.7. MÉTODOS SEPARATIVOS

Os métodos instrumentais separativos são os que pressupõem uma separação dos constituintes de interesse na amostra, antes de se efectuar a medida analítica propriamente dita. As técnicas utilizadas neste domínio são a cromatografia e a electroforese.

A cromatografia é essencialmente um método físico de separação em que os componentes a separar são distribuídos entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. Tal como o próprio nome indica, a fase estacionária é aquela que se encontra fixa, ancorada numa coluna, e a fase móvel é a que se movimenta, contactando intimamente com a fase estacionária ao longo da trajectória desse movimento. A separação ocorre em resultado de processos repetidos de adsorção e dessorção durante o movimento dos componentes da amostra, ao longo da fase estacionária, e a separação é devida à diferença de constantes de distribuição de cada um dos componentes da amostra.

Os trabalhos cromatográficos descritos na literatura para a determinação de cloretos são baseados em cromatografia iónica (Tabela I 7). Esta técnica permite a separação de espécies iónicas para posterior detecção condutimétrica. Esta detecção mede a condutividade das soluções que passam pelo detector. Em termos práticos, todas as espécies iónicas dão origem a um sinal analítico, cuja sensibilidade depende da natureza da espécie em causa e da sua concentração.

Os parâmetros analíticos reportados para esses métodos são adequados à análise de amostras com baixos teores de sal [62-67]. Os limites de detecção são baixos, desde 0,055 [62] a 19 μg L^{-1} [65]. Os limites inferiores de resposta linear variam entre 0,05 [62] e 100 μg mL^{-1} [65]. Os limites superiores para essa resposta linear variam entre 5 e 10 vezes o valor da concentração a partir da qual o comportamento analítico é considerado linear.

No entanto, os métodos são morosos, envolvendo períodos de tempo longos no tratamento das amostras e no traçado da curva de calibração, dispendiosos, devido à pureza elevada dos reagentes utilizados e ao elevado custo do equipamento e da manutenção associada e tóxicos para o meio ambiente (as fases móveis são geralmente solventes orgânicos).

A electroforese capilar (EC) é uma técnica que consiste no transporte de partículas carregadas, por aplicação de um campo eléctrico, e que utiliza tubos capilares para obter uma alta eficiência de separação, quer de moléculas grandes quer de moléculas pequenas. Estas separações são facilitadas por altas voltagens, as quais geram fluxos electro-osmóticos e electroforéticos de soluções tampão e de espécies iónicas respectivamente, dentro do capilar.

A configuração instrumental básica para a EC é relativamente simples. Tudo o que é preciso é um capilar de sílica fundida com uma janela óptica, uma fonte de energia de alta voltagem controlável, desde -25 kV [69,71] a 30 kV [68], dois eléctrodos, dois reservatórios para tampões e um detector. As extremidades do capilar são colocadas nos reservatórios de tampão e a janela óptica é alinhada com o detector (UV) a 254 nm [68,70] (Tabela I 8).

Tal como nos métodos cromatográficos, os métodos electroforéticos apresentam características analíticas adequados à análise de amostras com baixos teores em cloreto. Os limites de detecção indicados nos artigos dedicados a esta determinação variam entre 0,05 [69] e 1000 μg mL^{-1} [70]. A menor concentração a partir da qual a resposta é linear varia entre 0,05 e 10 μg mL^{-1}.

Genericamente, os métodos baseados em técnicas separativas fornecem resultados analíticos de boa precisão e exactidão. Numa perspectiva da sua aplicação ao controlo de rotina, é importante referir a necessidade de estabelecer alguns procedimentos, que podem ser complexos, antes de se proceder à introdução das soluções a ensaiar no sistema separativo. São exemplos a desgaseificação e filtração, e longos períodos de condicionamento da coluna de separação apropriada, etc. O equipamento envolvido é, também, dispendioso e requer pessoal especializado para o seu funcionamento.

Neste sentido, a implementação destas metodologias em controlo analítico de rotina poderá não ser a mais adequada, pela impossibilidade de realização de análises expeditas. Em alternativa, encontram-se também os métodos electroanalíticos na literatura.

Tabela I-7 Determinação de cloretos por cromatografia iónica com detecção condutimétrica

Amostra	*Características do método*								*REF*
	FE	*FM (mM)*	*LD ($\mu g\ mL^{-1}$)*	*IL ($\mu g\ mL^{-1}$)*	*Declive ($\mu g\ mL^{-1}$)*	*VI (μL)*	*Fluxo ($ml\ min^{-1}$)*	*t_r (min)*	*Ano*
Nuclear - Grade Boron Carbide	Metrosep Anion Dual – 2 (75 mm x 4,6 mm i.d)	1,3 mM Na_2CO_3 + 2 mM $NaHCO_3$	0,055	0,05 – 10	0,024	20	0,8	<6	[62] 2004
Águas Subterrâneas	Dionex AS11 (4 mm i.d)	21 mM NaOH	n.a	0,1 – 10	n.a	10	n.a	<10	[63] 2000
Amostras Vegetais	IC - PAK	1,3 mM Gluconato de Sódio + 1,3 mM Borax	0,17	0 – 0,60	n.a	100	0,6	<6	[64] 2000
Gelo Polar	IC 10 µm (150 mm x 3 mm i.d)	2 mM Hidrogenoftalato de Potássio	19	100-1000	n.a	n.a	1	n.a	[65] 1997
Mostarda	5 µm PRP – X100 (125 mm x 4 mm i.d)	Ácido Ftálico / 10% Acetona	n.a	n.a	n.a	20	1	1,5	[66] 1999
Soluções puras *of concrete*	CA A14 (250 x 4 mm i.d)	9 mM Carbonato de Sódio	0,35	1,77-5,45	n.a	20	1,2	2,7	[67] 2001

FE: Fase Estacionária; FM: Fase Móvel; Cond.: Condutimetria; LD: Limite de Detecção; IL: Intervalo de Linearidade; VI: Volume de Injecção; i.d: diâmetro interno; t_r: tempo de retenção; n.a: não aplicável.

Tabela I-8 Determinação de cloretos por Electroforese capilar

Amostra	*Características do método*							*REF*
	Solução Tampão	*Capilares*	*λ (nm)*	*LD (μg mL^{-1})*	*IL (μg mL^{-1})*	*t_r (min)*	*VA (kV)*	*Ano*
Água da chuva	5 mM de cromato de sódio+ 5 mM de ácido Bórico + 0,5 mM de tetradeciltrimetilamónio	Sílica fundida (57 cm l + 75 μm d.i)	254	n.a	0,18 – 7,09	8,1	8 - 30	[68] 1998
Água da chuva	100 mM de 2-(N-ciclohexamino) ácido etanossulfónico + 40 mM de LiOH	Sílica fundida (60 cm l + 50 mm d.i)	n.a	$2x10^{-3}$	0,05 - 20	7,2±0,2	-25	[69] 1997
Água natural	2,25 mM de ácido piromelitico + 6,5 mM de NaOH + 0,75 mM de Hidróxido de hexametoamónia + 1,6 mM trietanolamina	Sílica fundida (77 cm l + 50 μm d.i + 365 μm d.e)	254	0,1	10 - 1000	11,24±0,07	20	[70] 2002
Combustível	10 mM de cromato + 0,75 mM de brometo de hexametoamónia	Sílica fundida (40 cm l + 75 μm d.i + 375 μm d.e)	n.a	0,041	0,065–0,65	<3 min	-25	[71] 2004

λ: Comprimento de onda; LD: Limite de Detecção; IL: Intervalo de Linearidade; t_r: tempo de retenção; i.d: diâmetro interno; VA: Voltagem Aplicada; n.a: não aplicável.

I.8. MÉTODOS ELECTROANALÍTICOS

Nos métodos electroanalíticos, a informação sobre a solução em estudo é obtida pela medida de uma propriedade de natureza eléctrica. Estes métodos apresentam algumas vantagens relativamente a outros métodos instrumentais. As medidas são, na sua maioria, selectivas para um determinado elemento e o equipamento requerido é pouco dispendioso. Para além disso, estes métodos permitem obter informação quantitativa para quantidades de analito, muitas vezes, vestigiais. Podem, também, fornecer informação sobre a estequiometria e constantes de equilíbrio, processos de transferência de massa, velocidade e reversibilidade de reacções, etc.

São diversas as estratégias instrumentais no campo electroanalítico, dando origem a múltiplas técnicas, como a potenciometria, a voltametria, a polarografia, etc.. Esta é a técnica referida com mais frequência para a determinação de cloretos em alimentos, abarcando desde a potenciometria convencional, por leitura directa [72,73,74] ou por titulação [75,76,77], até diversos métodos em fluxo.

Quando o método electroanalítico utilizado não pressupõe processos de transferência electrónica (corrente zero), a técnica em causa toma o nome particular de potenciometria. A potenciometria requer uma célula electroquímica constituída por dois eléctrodos para medição de uma diferença de potencial. Um dos eléctrodos é conhecido por eléctrodo de referência e mantém o seu potencial constante. O outro é o eléctrodo indicador e fornece potenciais vários de acordo com a composição da solução em estudo.

Estão descritos diversos eléctrodos na literatura construídos para a determinação de cloretos (Tabela I 9) em alimentos, em fluxo. Apresentam-se em várias configurações e com membranas de condutor móvel ou membranas de natureza cristalina. Estes eléctrodos são baseados em membranas de condutor móvel - utilizam membranas sensoras com base em catiões volumosos, como por exemplo, os sais de catiões de amónio quaternário que têm sido usados como sensores para inúmeras espécies aniónicas, ou membranas cristalinas – formadas por uma única substância ou por uma mistura homogénea de substâncias.

A aplicação de detectores potenciométricos a sistemas de fluxo tem contribuído, também, para a difusão da sua aplicação, sobretudo em controlo de qualidade. Desta associação decorrem também, em numerosas situações, algumas vantagens para os ISEs [78], nomeadamente:

- aumento de precisão da resposta analítica, dado que o eléctrodo é exposto a todas as amostras por um período fixo de tempo;

- aumento de selectividade, resultante da discriminação cinética da membrana selectiva para os iões interferentes (aos quais responde mais lentamente);
- aumento de tempo de vida, dado que a membrana selectiva não é sujeita a um contacto prolongado com substâncias presentes nas amostras que a possam "danificar".

De uma forma geral, os intervalos de resposta analítica são alargados, geralmente entre 0,11 e 5000 mg L^{-1}, no entanto, na Tabela I 9 verifica-se que quando a membrana aplicada é polimérica, os intervalos de linearidade são mais alargados do que quando se usa uma membrana cristalina, com limites de detecção na ordem dos 0,071 mg L^{-1}. Quando a metodologia envolvida inclui procedimentos de pré-concentração do analito, torna-se possível alcançar limites de detecção para os detectores potenciométricos que igualam ou suplantam os fornecidos por técnicas bem mais sofisticadas e dispendiosas.

Com algumas excepções, os ISEs respondem também com grande rapidez, dependendo contudo do tipo em questão e da concentração do analito. Têm boa estabilidade de potenciais ao longo do tempo e respondem numa ampla faixa de concentrações. Esta é uma grande vantagem em comparação com outras técnicas de detecção, tais como espectrofotometria, espectrometria de emissão/absorção atómica com chama, polarografia, onde a faixa de resposta dos instrumentos é muito menor.

Os ISEs não são afectados pela cor ou turvação das amostras; normalmente não precisam da adição de um reagente específico. São na maioria dos casos suficientemente selectivos, e fáceis de operar, podendo ser facilmente construídos no laboratório. Estas características tornam a sua aplicação muito abrangente.

Além das vantagens enunciadas, é de salientar o baixo custo dos detectores e do equipamento por eles requerido. Neste sentido, o tempo e o custo envolvidos numa determinação analítica com eléctrodos selectivos de membrana são francamente reduzidos. Estes aspectos podem ainda ser melhorados quando se opta pela incorporação destes detectores em sistemas de análise por injecção em fluxo.

Pela análise das Tabelas I 9, 10, 11, verifica-se que utilizando a potenciometria em fluxo na determinação de cloretos a frequência amostral é mais elevada 60 [61,68] a 90 [79] amostras por hora do que a potenciometria em SIA - 15 [72] amostras por hora e em estado estacionário - 25 a 40 [48] amostras por hora.

Os métodos baseados em sistemas FIA permitem uma frequência amostral superior. Esta rapidez está associada a limites de detecção superiores aos encontrados nos métodos referenciados anteriormente.

Tabela I-9 Determinação de cloretos por potenciometria em estado estacionário (EE)

Amostra	Eléctrodo	Características do método					REF [Ano]
		LD (mg L^{-1})	IL (mg L^{-1})	Declive (mV/década)	VI (µL)	FA (amostras h^{-1})	
Leite e Água de Côco	Membrana cristalina com filme de Ag/AgCl depositado electroliticamente	n.a	10 - 860	57±3	n.a	n.a	[79] 2005
Bebidas Carbonatadas	Membrana polimérica (**S** – Valinomicina; **SM** – bis-2-etil-exil-adipato; **SI** – PVC; **A**-Tetrafluoroborato de potássio)	n.a	3,5 - $3x10^3$	56,3±0,5	50	n.a	[74] 2000
Biológicas e Ambientais	Membrana polimérica (**S** – Ruténio (III); **SM** – acetofenona; **SI** – PVC; **A** - brometo hexadeciltrimetilamónio)	0,071	0,11 - 3545	-54,04±0,2	n.a	n.a	[83] 2003
Solo	Tubos de prata condicionados com uma solução concentrada de $FeCl_3$ a pH 1	1,2	50 - 5000	54,2±1,4	200	25 - 40	[48] 2003
Água	Membrana cristalina de Ag/AgS para cloretos	0,9	4 - 3500	-58,9±0,2	n.a	30	[72] 2002

EE: Estado Estacionário; LD: Limite de Detecção; IL: Intervalo de Linearidade; VI: Volume de Injecção; FA: Frequência Analítica; S: sensor; SM: Solvente mediador; SI: Suporte Imobilizador; A: Aditivo; n.a: não aplicável.

Tabela I-10 Determinação de cloretos por potenciometria em fluxo (FIA)

Amostra	Eléctrodo	Características do método						REF
		LD ($mg\ L^{-1}$)	IL ($mg\ L^{-1}$)	Declive (mV/década)	VI (µL)	Fluxo ($ml\ min^{-1}$)	FA (amostras h^{-1})	Ano
Leite e Água de Côco	Membrana cristalina de Ag/AgCl	0,4	4 - 1000	≈ 22	50	4	90	[79] 2005
Bebidas Carbonatadas	Membrana polimérica (**S** – Valinomicina; **SM** – bis-2-etilexiladipato; **SI** – PVC; **A**-Tetraflourborato de potássio)	n.a	$3,5 - 3x10^3$	-56,3±0,5	50	1	n.a	[74] 2000
Águas Naturais	Membrana cristalina com Ag/AgCl depositado electroliticamente	0,8	10 – 50	n.a	250	2	60	[68] 1999
Formulações Farmacêuticas	Membrana polimérica (**S** – cloro (2,3,7,8,12,13,17,18 – octaetilporfirinato) Indium (III); **SM** – éter ortonitrofeniloctílico; **SI** – PVC; **A**-tetrakis [3,5 – bis(trifluorometil) fenil] borato de potássio)	n.a	0,35 – 354,5	-87,5±1,1	6000	6	60	[61] 2004

LD: Limite de Detecção; IL: Intervalo de Linearidade; VI: Volume de Injecção; FA: Frequência Analítica; S: sensor; SM: Solvente mediador; SI: Suporte Imobilizador; A: Aditivo; n.a: não aplicável.

Tabela I-11 Determinação de cloretos por potenciometria em SIA

Amostra	Eléctrodo	Características do método						REF
		LD ($mg\ L^{-1}$)	IL ($mg\ L^{-1}$)	Declive (mV/década)	VI (µL)	Fluxo ($ml\ min^{-1}$)	FA (amostras h^{-1})	Ano
Água	Membrana cristalina de Ag/AgS para cloretos	1,6	10 – 3500	-54,6±0,2	n.a	n.a	15	[72] 2002
Soluções de Cloreto	Membrana cristalina de Ag/AgCl	1,8	0,21 – 3,50	n.a	927	2,6	n.a	[80] 2004

LD: Limite de Detecção; IL: Intervalo de Linearidade; VI: Volume de Injecção; FA: Frequência Analítica; n.a: não aplicável.

II. POTENCIOCIOMETRIA

II.1. GENERALIDADES

A potenciometria é uma técnica que estabelece relações entre a diferença de potencial de dois eléctrodos mergulados numa solução e a actividade de espécies presentes na referida solução. A sua aplicação em química analítica é vasta, sendo, sobretudo, de natureza quantitativa. Em termos práticos esta aplicação baseia-se na:

- determinação do valor da diferença de potencial e sua relação com a concentração de uma determinada espécie em solução (Potenciometria Directa);
- comparação do valor da diferença de potencial entre dois semi-elementos que diferem exclusivamente na concentração da espécie a dosear (Pilhas de Concentração);
- e na detecção do ponto final de uma titulação a partir das determinações potenciométricas (Titulações Potenciométricas).

O interesse e a aplicação das medidas potenciométricas foram aumentando durante o século XX, na medida em que os avanços da electrónica permitiam construir aparelhos de maior razão sinal/ruído e de portabilidade facilitada. Por volta dos anos sessenta a potenciometria estava presente na maioria dos laboratórios através dos eléctrodos de vidro utilizados para monitorar o pH e de alguns eléctrodos metálicos, constituídos por um metal revestido de um dos seus sais pouco solúveis. Nessa época os eléctrodos apresentavam características insatisfatórias relacionadas com a falta de reprodutibilidade e de estabilidade e com os longos tempos de resposta.

O aparecimento de eléctrodos selectivos comercializados na Hungria, por volta de 1965, foi o início de uma nova fase de desenvolvimento técnico. Esses eléctrodos eram selectivos a Ag^+, a Cl^-, a Br^- e a I^-. Em 1966 surgiu um eléctrodo sensível a F^- [81]. Esta unidade produziu grande impacto na época devido à importância da análise deste ião em águas potáveis, às dificuldades associadas ao processo analítico convencional e às óptimas características do eléctrodo. No ano seguinte Ross concebeu, pela primeira vez, um eléctrodo em que o sensor era um líquido mantido num suporte inerte (Figura II-1).

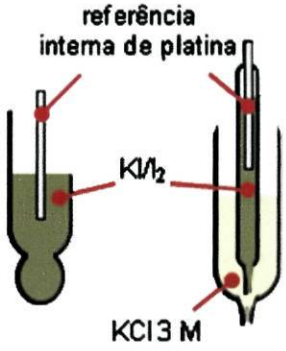


Figura II-1 Sistema de referência para o eléctrodo de pH de "Ross"

Nas últimas décadas têm surgido uma vasta gama de eléctrodos destinados a fins comerciais ou meramente académicos, que se vieram juntar aos eléctrodos de vidro já largamente divulgados. Os eléctrodos indicadores mais utilizados na actualidade são os eléctrodos selectivos de ião (ISE, do inglês *Ion Selective Electrode*).

A ampla aplicação analítica dos ISEs decorre da elevada selectividade que apresentam e do seu fácil acoplamento a sistemas de Análise por Injecção em Fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis)* [82]. Idealmente, quando se pretende acoplar um detector a FIA, este deverá apresentar uma resposta rápida (no sentido de atingir frequências analíticas elevadas), uma resposta analítica para uma gama de concentrações alargada (o que simplifica a montagem), ser reprodutível (por forma a evitar sucessivas calibrações do sistema analítico), apresentar um baixo ruído eléctrico, uma boa estabilidade e, ainda, ser compatível com sistemas de aquisição de dados [83]. Os ISEs cumprem estes requisitos, tornando-se vantajosa a sua associação a sistemas FIA.

II.2. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

De acordo com as recomendações da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 1994, o ISE é um sensor electroquímico, baseado num pequeno filme ou numa membrana selectiva como elemento de reconhecimento, o que os torna distintos de outros

sistemas que envolvem reacções redox [84].

As diferenças de potencial medidas (potencial ISE *versus* potencial de eléctrodo de referência "externo") são linearmente dependentes do logaritmo da actividade de um dado ião em solução (equação II.1). A representação gráfica de actividade em função da diferença de potencial é designada de curva de calibração.

$$E = "Constante" + \frac{2{,}303RT}{Z_A F} x \log a_A$$

Equação II-1 Equação de Nernst-Nicolski. E: valor experimental de potencial de um ISE; R: constante dos gases perfeitos, 8,3144 J K^{-1} mol^{-1}; T: temperatura termodinâmica, K; F: constante de Faraday, $9{,}64846 \times 10^4$ C mol^{-1}; z_A: carga do ião principal; a_A: actividade do ião principal, mol L^{-1} ou mol kg^{-1}; "constante": inclui o potencial normal do eléctrodo selectivo, o potencial do eléctrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV.

As curvas de calibração potenciométrica apresentam três parâmetros relevantes: o limite inferior de resposta linear (LIRL), o limite de detecção (LD) e o declive (Figura II-2)[85]. O LIRL é o valor de concentração a partir do qual a resposta potenciométrica típica apresenta um comportamento linear. O LD é o valor de intercepção entre os segmentos que prolongam os comportamentos linear e não linear. O declive traduz a qualidade da resposta potenciométrica, devendo assumir, em condições normais de pressão e temperatura, um valor de cerca de $59/z_A$ mV/década.

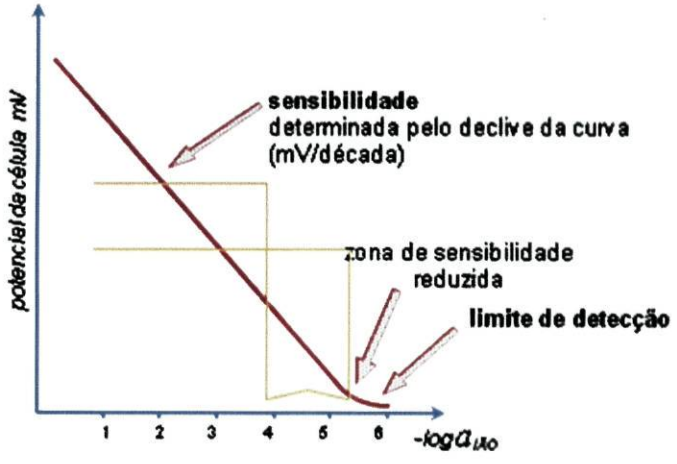


Figura II-2 Características gerais da curva de calibração

Para que se possa utilizar a entidade concentração em vez de actividade, e consequentemente validar a equação de Nernst (Equação II-1), é necessário proceder-se ao ajuste da força iónica das soluções. O valor de força iónica traduz, de forma simples, a carga iónica global da solução (Equação II-2). Como ajustador são utilizados electrólitos simples, cuja composição não deverá conter o ião principal.

$$I = \sum_{i=1}^{n} c_i z_i^2$$

Equação II-2 Cálculo da força iónica (I) de uma solução, que é a medida da intensidade do campo eléctrico devido à presença dos iões em solução. ci: concentração do ião, mol L^{-1}; zi: carga do ião.

De acordo com as recomendações da IUPAC [84] o tempo de resposta dos eléctrodos é aquele que decorre entre o momento em que os eléctrodos, indicador e selectivo de ião, são colocados em contacto com uma solução da amostra (ou na qual se varia a actividade ou concentração de ião principal) e o primeiro instante em que o declive ΔE/Δt iguala um valor limite estabelecido (Figura II-3). Este valor limite era estabelecido com base em questões de ordem experimental ou na exactidão pretendida para a leitura potenciométrica.

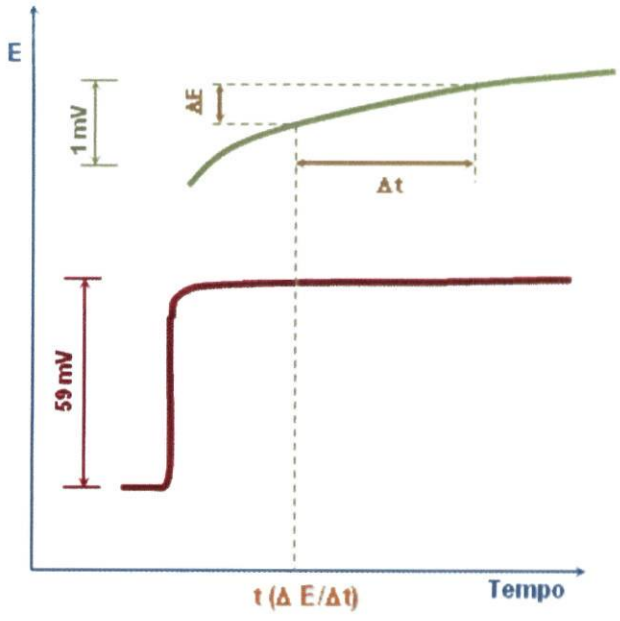


Figura II-3 Representação gráfica do tempo de resposta, t (ΔE/Δt), de uma célula de eléctrodo selectivo de ião.

A selectividade de uma unidade potenciométrica traduz a sua capacidade de discriminar, em meios complexos, o ião para o qual o ISE é selectivo. Neste sentido, o potencial de uma célula de ISE numa solução que contenha o ião principal, A, e um outro ião, B, é expresso pela equação de Nicolsky-Eisenmam (Equação III-3). A influência do ião coexistente é traduzida pela sua concentração e pelo coeficiente de selectividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$.

$$E = constante + \frac{2,303RT}{z_A F} log\left[a_A + \sum_{i=1}^{n} K_{A,B_i}^{pot} (a_{Bi})^{z_A/z_{Bi}} \right]$$

Equação II-3 Equação de Nicolsky-Eisenman. E: valor experimental de potencial de um ISE; R: constante dos gases perfeitos, 8,3144 J K-1 mol-1; T: temperatura termodinâmica, K; F: constante de Faraday, 9,64846x104 C mol-1; aA: actividade do ião principal, mol l^{-1} ou mol kg^{-1}; aB: actividade de espécie iónica interferente; zA: número inteiro de sinal e magnitude da carga do ião principal; zB: número inteiro de sinal e magnitude da carga de iões interferentes; "constante": inclui o potencial normal do eléctrodo selectivo, o potencial do eléctrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV; K: coeficiente de selectividade potenciométrica relativamente ao ião interferente.

Os coeficientes de selectividade potenciométrica podem ser calculados por vários métodos: (i) o das soluções separadas; (ii) o das soluções mistas; (iii) e o *matched potential*. Cada um destes métodos oferece valores diferentes, que só podem ser interpretados como valores meramente orientadores do grau de selectividade. Entre estes métodos, o mais simples é o método das soluções separadas. O método das soluções mistas e o *matched potential* apresentam algumas limitações práticas, decorrentes, respectivamente, da não aplicabilidade da equação de Nernst e da falta de capacidade do ião interferente capaz de igualar o potencial do ião principal.

O método das soluções separadas compara os potenciais de uma célula de ISE quando imersa numa solução de ião principal (A) ou numa solução de ião interferente (B), ambas com o mesmo valor de actividade (ou concentração) (Equação II-4). Teoricamente, dir-se-á que o valor $(z_A F)/(2,303RT)$ é correspondente ao inverso do valor do declive teórico de um ISE. Mediante especificação das condições experimentais, substitui-se esse parâmetro pelo declive da curva de calibração da célula potenciométrica.

$$log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A) z_A F}{2,303RT} + \left(1 - \frac{z_A}{z_B}\right) log[a_A]$$

Equação II-4 Fórmula utilizada no cálculo do coeficiente de selectividade pelo método das soluções separadas.

De acordo com o tipo de membrana que incorporam ou com o mecanismo envolvido no seu funcionamento, os ISEs podem subdividir-se em eléctrodos selectivos de ião primário, de membrana múltipla ou de compostos e de contacto metálico ou *all solid state* [84]. Dentro da primeira categoria incluem-se os eléctrodos cristalinos, homogéneos ou heterogéneos, e os não cristalinos, de matriz rígida ou de condutor móvel. Qualquer um destes eléctrodos pode ser acoplado a sistemas em fluxo, apresentando até algumas vantagens analíticas decorrentes desta associação.

II.3. FIA EM POTENCIOMETRIA

A metodologia FIA é baseada na intercalação de pequenos volumes de amostra, rigorosamente medidos, num fluído transportador que os arrasta ao longo do sistema. Durante este processo, podem ocorrer interacções entre ambos, que vão desde uma simples diluição às reacções químicas mais complexas. Desde a sua implementação, com [85], a metodologia FIA tem evoluído no sentido de estabelecer sistemas que permitam efectuar alguns procedimentos complexos no interior da montagem [85,86]. Um exemplo representativo desta situação é a extracção líquido-líquido, conseguida habitualmente através de reactores de extracção e de membranas de separação de fases, colocadas ao lado da montagem. Este procedimento é mais rápido e reprodutível que o ensaio discreto correspondente e elimina o contacto directo do operador com solventes tóxicos.

A aplicação de detectores potenciométricos a sistemas de fluxo não é recente mas apresenta uma importância crescente, dada a necessidade permanente de implementar técnicas de análise automáticas e de miniaturar os aparelhos de medida [87]. As montagens FIA utilizadas em determinações potenciométricas são muito simples. São constituídas por um sistema propulsor (que assegura o movimento das soluções no seu interior), um sistema de injecção (que permite intercalar volumes de amostra, rigorosos e reprodutíveis, no fluxo transportador), e um sistema de detecção, constituído pelos eléctrodos selectivo (configuração tubular) e de referência, acoplados a um milivoltímetro, e um eléctrodo de "terra", constituído por um metal, que permite eliminar a variação de corrente produzida pelo movimento do fluxo (Figura II 4). Este eléctrodo é, de uma forma geral, colocado imediatamente antes do sistema de detecção [79].

A configuração do detector potenciométrico e a sua incorporação nos sistemas FIA são factores de grande importância nestes sistemas, podendo distinguir-se dois grandes grupos: os ISEs que apresentam uma configuração convencional e aqueles cuja configuração foi expressamente construída para a sua adaptação nesses sistemas [88].

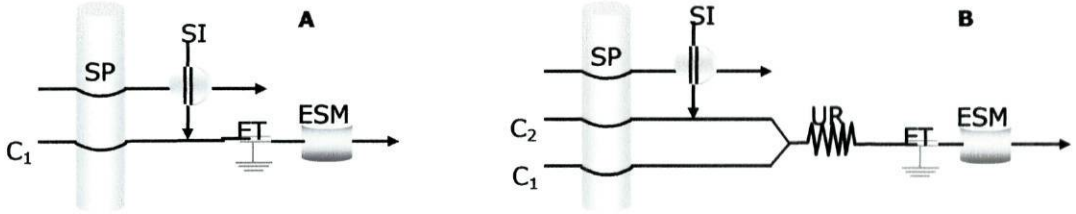


Figura II-4 Configuração usual das montagens FIA contendo ISEs para leitura directa (A) e para o ajuste às condições de leitura no interior do sistema. SP: sistema de propulsão; SI: sistema de injecção; ET: eléctrodo de terra; SD: sistema de detecção; UR: unidade de reacção; C: soluções de transporte (C_1 é geralmente uma solução ajustadora) [89]

No que se refere a ISEs de configuração convencional, a sua incorporação em sistemas FIA é conseguida com base em vários arranjos. Os primeiros são propostos por Ruzicka e Hansen e foram designados por *cascade* (Figura II 5) [91,92]. Estes arranjos em "cascata" são contudo mecanicamente instáveis, além de apresentarem um percurso não constante de solução ao longo da membrana, originando por isso grandes oscilações nos potenciais fornecidos pelo sistema.

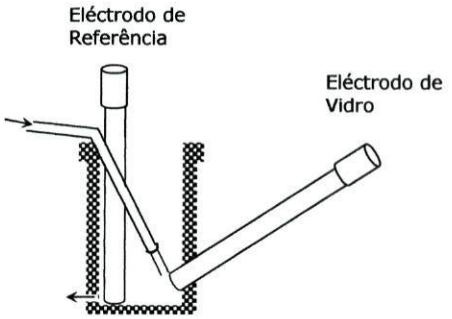


Figura II-5 O arranjo típico em "cascata", utilizado para a adaptação dos ISEs de configuração convencional aos sistemas FIA.

Sem estas limitações, surgem entretanto as cápsulas de fluxo (*flow-through caps*), as quais permitem uma fácil inserção dos detectores na montagem FIA. Contudo, elas motivam o aparecimento de "uma câmara de diluição" para o troço de amostra intercalado no fluxo (Figura II-6), favorecendo uma baixa frequência analítica e um aumento, que poderá ser significativo, da concentração mínima detectada [89].

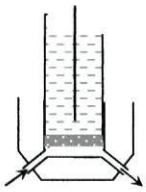


Figura II-6 O arranjo em *flow-through caps*, utilizado para a adaptação dos ISEs de configuração convencional aos sistemas FIA.

Os arranjos em *Wall-jet* constituem também uma das propostas presentes na literatura. Esta construção envolve a projecção uniforme da solução em fluxo ao longo de toda a membrana de um eléctrodo convencional. Uma das suas representações é indicada na Figura II-7, e constitui o arranjo utilizado por Solich [88].

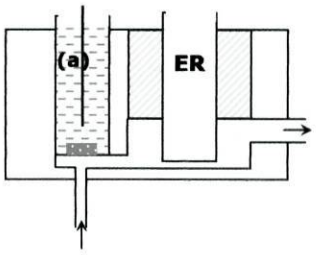


Figura II-7 O arranjo típico em *Wall-jet*, utilizado para a adaptação dos ISEs de configuração convencional aos sistemas FIA. ER: eléctrodo de referência; (a): solução de referência interna do eléctrodo selectivo.

Uma outra construção proposta na literatura é a designada por *Sandwich* [93]. É geralmente constituída por duas peças, uma contendo uma cavidade preenchida com uma membrana sensora e outra que determina o percurso tangencial do fluxo através do sensor. Uma vez unidas aquelas duas peças, a unidade resultante apresenta uma maior estabilidade mecânica do que as cápsulas de fluxo, mas produz sinais de elevado ruído eléctrico.

Genericamente, para os ISEs de configuração convencional salientam-se os reduzidos tempos de vida que os caracterizam. A inserção destes em sistema FIA fornece também, de uma forma geral, frequências analíticas bastante reduzidas.

Os ISEs de configuração tubular permitem manter as características hidrodinâmicas das soluções que fluem no interior da montagem e envolvem volumes internos muito reduzidos, evitando a dispersão da amostra à sua passagem pelo detector. Em termos gerais, e quando comparados com as construções convencionais, os detectores tubulares apresentam uma maior sensibilidade e proporcionam uma maior rapidez analítica. A utilização desta

configuração permite ainda que a detecção potenciométrica deixe de ser inevitavelmente um processo em fim de linha, podendo proceder-se à sua incorporação em montagens capazes de realizar determinações sequenciais [94], i.e., em que a amostra atravessa o detector, que pode ou não ser potenciométrico.

No que diz respeito às configurações tubulares estabelecidas, os ISEs podem ser novamente divididos em dois grandes grupos [89]: aqueles com eléctrodo e solução de referência internos [95,96] e aqueles com sistema sensor ligado directamente a um suporte condutor [97,98] (Figura II 8). Estes últimos apresentam os tempos de vida mais longos e são mais baratos e mais fáceis de manipular.

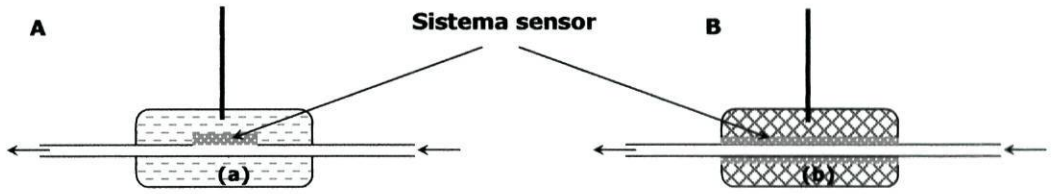


Figura II-8 Arranjos típicos de ISEs de configuração tubular em sistemas FIA. A: com solução de referência interna, (a); B: sistema sensor em contacto com um suporte condutor, (b).

Um outro factor preponderante nos sistemas FIA com detecção potenciométrica prende-se com a inserção do eléctrodo de referência e o seu posicionamento na montagem. Na maioria dos casos, este eléctrodo é colocado em fim de linha, quer colocando-o num recipiente colector do fluxo, quer adaptando-o a módulos de suporte e inserindo-os directamente no sistema. O recurso actual a eléctrodos de referência comerciais não conduz também a preocupações de maior.

O sinal analítico de ISEs inseridos numa montagem FIA originamum sinal transiente, atribuindo-se a designação global de "Fiagrama" ao registo global. Cada solução padrão é inserida individualmente num transportador e percorre sempre um mesmo trajecto até ao detector. O sinal de base indicado resulta do sinal da solução de transporte, em contacto contínuo com o detector. À medida que o troço de amostra de aproxima o sinal altera-se num determinado sentido, atingindo o seu valor máximo quando a zona de menor dispersão atravessa o detector.

O grau de dispersão é um dos aspectos mais importantes na descrição do desempenho de um sistema de fluxo, dado que ele determina, entre outras características, o grau de diluição da amostra [84]. O valor de dispersão no interior de uma montagem de fluxo associa-se a um processo de diluição contínua com a solução de transporte [99] e a

extensão de diluição afecta, de forma mais ou menos evidente, o valor de concentração a partir do qual o eléctrodo apresenta uma resposta linear e a sensibilidade dessa resposta analítica.

Existem vários modelos matemáticos para a determinação da dispersão mas as variáveis envolvidas limitam grandemente a sua aplicação [99]. Para uma montagem simples e sem reacção química envolvida é possível estimar a dispersão por experimentação, englobando todos os factores contribuintes para a dispersão num único bloco. Para o efeito, determina-se, numa primeira fase, a altura do sinal analítico correspondente a condições de estado estacionário (H_0). Em caso de dispersão, uma solução introduzida no sistema apresenta uma altura de sinal analítico (H) inferior àquele correspondente ao estado estacionário (H_0) (Figura II-9). Para o cálculo da dispersão (D) poderá aplicar-se a equação II-5 [100].

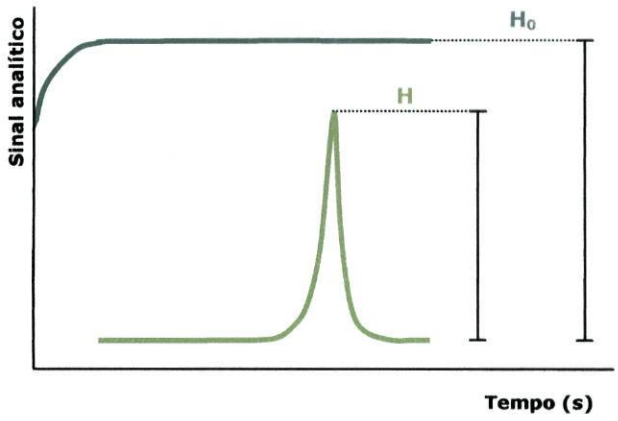


Figura II-9 Sinais analíticos correspondentes a condições equivalentes ao estado estacionário (H0) e após injecção de um volume de amostra (H).

$$\log D = (H_0 - H) / S$$

Equação II-5 Cálculo da dispersão. D: dispersão; H_0: altura do sinal analítico (mV) correspondente ao estado estacionário, para uma determinada concentração de ião principal; H: altura do sinal analítico (mV) em condições experimentais definidas e para uma solução de concentração de ião principal igual àquela envolvida no determinação de H_0; S: declive da resposta linear do detector potenciométrico.

O tempo de resposta dos detectores em fluxo está relacionado com as características de resposta dos detectores tubulares e com as condições experimentais escolhidas para cada montagem FIA. As condições mais críticas são o caudal e o volume de injecção. Por este

motivo, o tempo de resposta é muitas vezes substituído por frequência de amostragem. Na prática, e de acordo com as normas da IUPAC [84] determina-se a frequência com que porções subsequentes de amostra podem ser injectados sem que a sua leitura fosse afectada por sinais precedentes.

De uma forma geral, a associação entre potenciometria e FIA origina, em numerosas situações, algumas vantagens para os ISEs [99]. Algumas dessas vantagens encontradas com maior frequência na literatura são:

- o aumento de precisão da resposta analítica, dado que o eléctrodo é exposto a todas as amostras por um período fixo de tempo;
- o aumento da selectividade, resultante da discriminação cinética da membrana selectiva para os iões interferentes (aos quais responde mais lentamente);
- e aumento do tempo de vida, dado que a membrana selectiva não é sujeita a um contacto prolongado com substâncias presentes nas amostras que a possam "danificar".

As vantagens decorrentes da associação de detectores potenciométricos a sistemas FIA tem conduzido à sua aplicação em diversas áreas, como a farmacêutica, a ambiental, a bioquímica e a alimentar.

II.4. APLICAÇÃO À ANÁLISE DE ALIMENTOS

A análise de alimentos é uma área muito exigente do ponto de vista do consumidor. Cada vez mais, é necessário salvaguardar a segurança dos alimentos, no sentido de ir de encontro às especificações legais e de preservar a Saúde Pública. A evolução tecnológica, a nível industrial e na saúde, tem impulsionado a análise alimentar. Cada vez mais se procuram métodos rápidos e simples, económicos e pouco poluentes.

A potenciomentria associada FIA apresenta algumas dessas características, proporcionando um aumento no número de detectores publicados nesta área ao longo das últimas décadas [79, 100-105]. Cerca de 83 % das análises efectuadas são aplicadas a bebidas (Figura II-10).

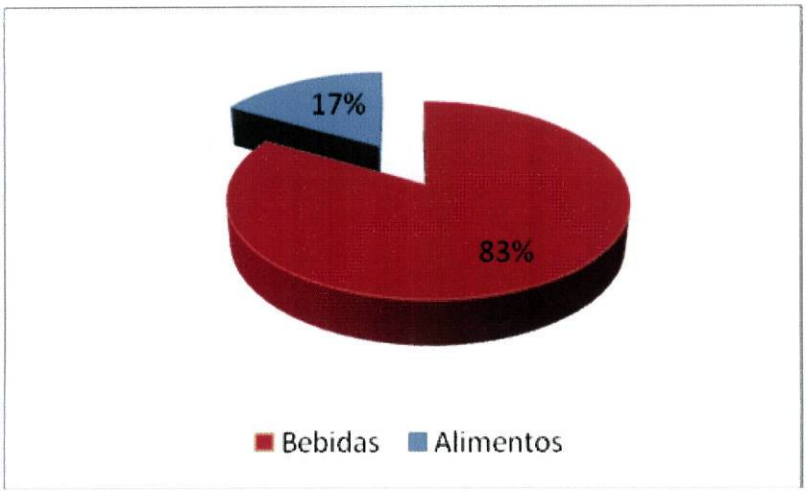


Figura II-10 Relação percentual de aplicação de métodos potenciométricos à análise de alimentos e de bebidas.

Na literatura é possível encontrar várias aplicações desta associação potenciometria e FIA. São diversas as amostras consideradas, tal como se pode verificar na Figura II-11. A água, a cerveja e o leite constituem as amostras mais focadas neste domínio [79,100,101,105-111].

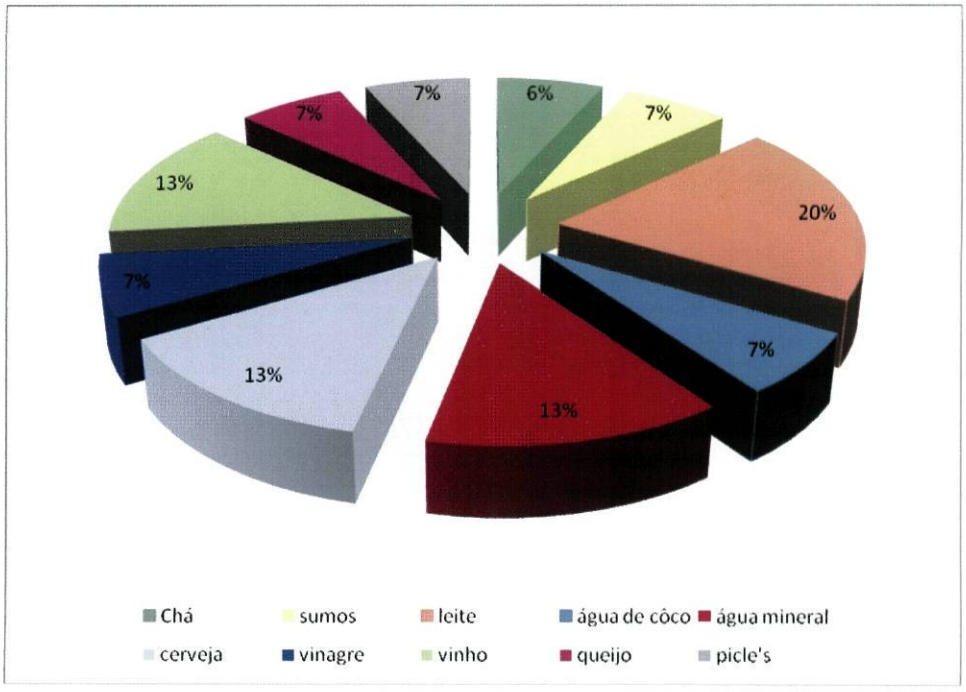


Figura II-11 Distribuição percentual dos métodos potenciométricos em FIA dedicados à análise de produtos alimentares.

As análises de pão são ainda escassas. Porém, as vantagens decorrentes de sistemas FIA associados a ISEs, justificam a aplicação destes sistemas na determinação de cloretos em pão.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Genericamente, o trabalho desenvolvido teve início na caracterização de eléctrodos selectivos a cloretos Ag/AgCl, com uma configuração tubular (0,8 mm de diâmetro interno e comprimentos variáveis). Os eléctrodos com melhores características foram aplicados na análise de pão e os resultados foram comparados com um método de fluxo aplicado em análises de rotina, cujos resultados foram validados por cromatografia iónica.

Ao longo deste capítulo são referidas as metodologias envolvidas na construção, na avaliação e na aplicação dos eléctrodos utilizados.

III.2. MATERIAL E APARELHOS UTILIZADOS

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 50,00 a 1000,00 mL. Para as medições de volumes rigorosos iguais ou superiores a 5,00 mL foram usadas pipetas volumétricas de vidro, classe A. Para volumes inferiores recorreu-se a pipetas automáticas Gilson®, modelos P100, P1000 e P5000, de volume regulável. As pesagens foram realizadas numa balança Kern 770, com precisão igual a 0,00001g.

Sempre que era necessário promover a dissolução de substâncias sólidas, numa tentativa de reduzir o tempo envolvido nesse processo, foi usado um banho de ultra-sons termostatizado, da marca Fungilab, S.A, *ultrasonic cleaner*.

As diferenças de potencial entre o eléctrodo indicador e o eléctrodo de referência foram medidas com um decimilivoltímetro Crison, μpH 2002 (sensibilidade ± 0,1 mV).

As montagens FIA eram constituídas por um sistema de propulsão, uma unidade de introdução da amostra, um sistema de transporte e/ou mistura de soluções e, ainda, uma unidade de detecção e registo dos sinais analíticos (Figura III-1).

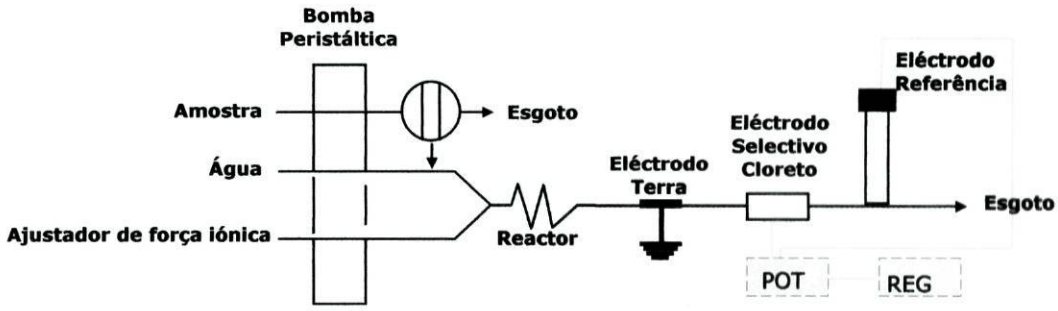


Figura III-1 Montagem FIA utilizada para avaliação e aplicação dos eléctrodos selectivos. POT: decimilivoltímetro; REG: registador.

Como sistema de propulsão utilizou-se uma bomba peristáltica, Gilson®, Minipuls 3, de quatro canais (Figura III-2). Os tubos de propulsão das soluções eram Tygon®, com diâmetro interno de 1,65 mm.

Figura III-2 Bomba peristáltica. Sistema de propulsão utilizado nas montagens FIA.

As amostras eram introduzidas em fluxo através de uma válvula de injecção rotatória manual, com quatro vias, da marca Rheodyne, 5020. Este sistema de injecção da amostra permitia a introdução de um volume de amostra fixo, cujo valor era definido pelo comprimento do tubo de Teflon®, com 0,8 mm de diâmetro interno (d.i). Ao longo do trabalho utilizaram-se volumes de amostragem de aproximadamente a 100, 200, 300, 400 e 500 μL.

Os tubos usados para o transporte da amostra ou outras soluções, ligações entre os vários elementos da montagem de fluxo, bem como as unidades de reacção utilizadas para promover a mistura da amostra com outra solução, eram também em Teflon® com 0,8 mm de d.i.. As unidades de reacção eram constituídas pelo mesmo material de Teflon®, formando um reactor "malha", cuja configuração conduzia a uma mistura adequada entre as soluções confluentes [112]. Sempre que necessário, a confluência das soluções foi estabelecida através de um dispositivo de configuração "Y", construído em Perspex®, poli(metacrilato de metilo). A ligação entre os vários elementos da montagem de fluxo era efectuada recorrendo ao mesmo tubo Teflon® com as extremidades *flangeadas*, às quais se adaptavam os terminais correspondentes, Teflon®, Omnifit. Em alternativa recorreu-se a "luvas", pequenos troços de tubos de impulsão com o diâmetro adequado.

O sistema de detecção era constituído pelos eléctrodos indicador e de referência, electricamente ligados ao decimilivoltímetro Crison, μpH 2002 (sensibilidade ± 0,1 mV). As diferenças de potencial entre os eléctrodos eram registadas por um registador Kipp & Zonen.

O eléctrodo indicador era o eléctrodo selectivo a cloretos, cuja construção se refere mais adiante, e o eléctrodo de referência era de cloreto de prata/prata, Orion, 90-02-00, de dupla junção (Figura III-3), contendo como soluções interna e externa as comercializadas para o efeito. A adaptação dos eléctrodos tubulares à montagem FIA foi feita por intermédio de luvas.

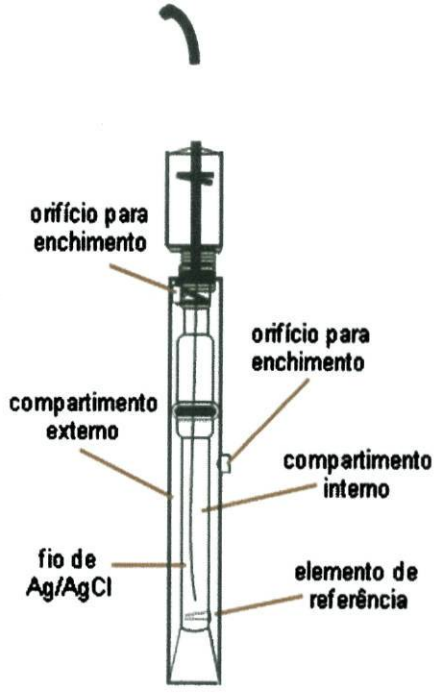


Figura III-3 Eléctrodo de prata/cloreto de prata de dupla junção.

Para eliminar o ruído eléctrico inseriu-se na montagem de fluxo um "eléctrodo de ligação à terra". Este eléctrodo consistia num tubo de aço com cerca de 0,8 mm de d.i. e 12 mm de comprimento, ao qual era soldado um cabo eléctrico [97].

Aquando do estudo da influência do pH das soluções nas características de resposta dos eléctrodos preparados utilizou-se um eléctrodo de vidro combinado WTW, CWL/S7, ligado a um decimilivoltímetro Metrohm 654, pH Meter. A homogeneização da solução ensaiada foi garantida por um agitador magnético.

O método utilizado para comparar os resultados das análises potenciométricas de cerca de 300 amostras de pão foi desenvolvido pela Skalar. A montagem envolvida era constituída por uma bomba peristáltica, um sistema de injecção automático, com amostrador automático, um detector UV / VIS (λ=490nm), um detector e um fotómetro, todas da marca Skalar.

A determinação de cloretos por cromatografia iónica foi realizada num cromatógrafo ICS-1000 (Dionex Sunnyvale, CA) equipado com uma bomba isocrática. O volume de injecção da amostra foi de 25 µL, as colunas analíticas incluíam uma pré-coluna Dionex AG-14A (50x4mm) e uma coluna analítica Dionex AS-14A (250x4mm). A detecção obtida por um detector de condutividade - célula DS6 heated Dionex com volume interno de 1,0 µL. A condutividade do eluente foi suprimida através do supressor aniónico Dionex ASRS Ultra II (4mm) no modo de regeneração por auto-supressão, aplicando-se uma corrente ao supressor de 50 mA. O fluxo de eluente foi de 1 mL min^{-1}. A aquisição e tratamento de dados foram efectuados através do software Chromeleon versão 6.6.

III.3. REAGENTES

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas era ultra-pura, com uma condutividade igual ou inferior a 0,054 µS cm^{-1} a 25ºC. As soluções aquosas mais concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes e posterior diluição em solução ajustadora dos valores de pH e/ou força iónica. As menos concentradas foram preparadas por diluição rigorosa das anteriores.

Todos os reagentes utilizados — cloreto de sódio (Merck), sulfato de sódio anidro (J.T.Baker), sulfato de amónio (M&B), brometo de potássio (Merck), ácido sulfúrico concentrado (Merck), iodeto de potássio (Merck), nitrato de potássio (Merck), nitrito de sódio (Riedel-de-Haen), salicilato de sódio (Merck), tiocianato de potássio (Merck) e fluoreto de sódio (Merck) — eram de qualidade p.a. ou semelhante, sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional.

Para o método de comparação utilizado utilizados ácido nítrico (Merck), reagente de Brij (Merck), tiocianato de mercúrio (Merck), metanol (Merck) e nitrato férrico (Merck). No método de cromatografia iónica todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultra-pura, tipo I, filtrada por membrana de 0,22 µm obtida com um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). O eluente 8 mM Na_2CO_3 / 1 mM $NaHCO_3$ (Merck) foi desgaseificado por introdução de azoto para a remoção de gases dissolvidos, principalmente de CO_2. As soluções padrão do analito, NaCl, foram preparadas através da diluição da solução padrão mãe de 1000 mg L^{-1} (Merck).

A calibração do sistema potenciométrico utilizado no controlo do pH das soluções foi baseada nas soluções tampão padronizadas da Merck.

III.4. SOLUÇÕES

Todas as soluções injectadas no sistema foram preparadas em água ultra-pura. As soluções padrão, de concentrações compreendidas entre $1{,}00\times10^{-4}$ e $1{,}00\times10^{-2}$ mol L^{-1}, foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução mãe de cloreto com uma concentração de cerca de $1{,}00\times10^{-2}$ mol L^{-1}. Esta solução foi obtida por dissolução de, cerca de, 0,29225 g em água para um volume final de 500,0 mL.

Para o ajuste da força iónica das soluções utilizaram-se soluções de sulfato de sódio, de concentração igual a 0,01 ou 0,1 mol L^{-1}.

Para o estudo do efeito do pH utilizou-se ácido sulfúrico concentrado e uma solução saturada de hidróxido de sódio. Todas as soluções de possíveis espécies interferentes foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes, seguida da sua dissolução e diluição rigorosa em água.

O método de comparação necessitou da preparação de diversas soluções. Uma das soluções era constituída por ácido nítrico (70%) e reagente de Brij 35 (30%); o ácido nítrico foi diluído em cerca de 900 mL de água destilada, foi adicionado 1 mL de Brij 35 e o volume foi completado até 1000.0 mL. Uma outra solução era constituída por reagente de Brij 35 diluído em 1000.0 mL de água destilada. A solução de desenvolvimento de cor era preparada por dissolução de 945 mg de tiocianato de mercúrio em 225 mL de metanol, seguida da adição de água até cerca de 800 mL. Adicionaram-se de seguida 45,5 mg de nitrato férrico, 7,1 mL de ácido nítrico (a 70%) e completou-se o volume até 1000.0 mL.

Para as análises por cromatografia iónica as soluções foram preparadas em água. As soluções padrão apresentavam concentrações em cloreto compreendidas entre $2{,}8\text{x}10^{-5}$ e $1{,}7\text{x}10^{-3}$ mg/L.

III.5. CONSTRUÇÃO DOS ELÉCTRODOS TUBULARES

Os eléctrodos foram construídos por corte transversal de um tubo de prata de 0,8 mm de d.i e com 0,5, 1,0, 1,5, 3,0 e 6,0 cm de comprimento. Foi soldado um fio eléctrico ao suporte, posteriormente isolado com cola de Perspex® (Figura III-4). Na outra extremidade adaptou-se, também, um terminal de BNC (Bayonet Nut Coupling).

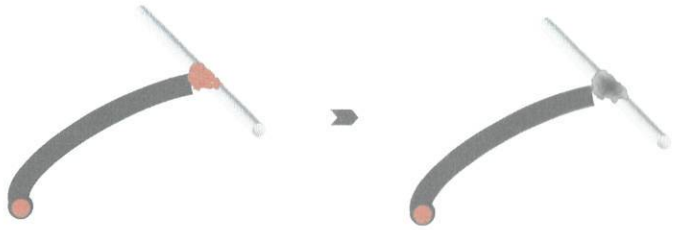


Figura III-4 Preparação do eléctrodo indicador. Adaptação do fio condutor interno de um cabo eléctrico blindado a um tubo de aço com 0,8 mm de d.i. e cerca de 12 mm de comprimento. Fixação do fio condutor ao tubo de aço com solda.

Os eléctrodos são acondicionados recorrendo a tubos de Teflon® aos quais se adaptavam "luvas", de forma a estabelecer um circuito fechado (Figura III-5).

Figura III-5 Condicionamento do eléctrodo selectivo pela adaptação de tubos de Teflon® nas extremidades do mesmo às quais se adaptavam "luvas".

III.6. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS ELÉCTRODOS

Para a avaliação da maior parte das características de funcionamento destes eléctrodos, realizou-se o traçado de várias curvas de calibração. A zona de operacionalidade das unidades em que a resposta do eléctrodo se mantinha praticamente inalterada perante variações do valor de pH da solução foi identificada através do traçado de diagramas de Reilley. Foi também avaliada a interferência de alguns compostos no sinal analítico através da determinação dos respectivos coeficientes de selectividade potenciométrica.

O procedimento experimental de calibração dos eléctrodos selectivos construídos foi efectuado numa montagem FIA, igual à indicada na (Figura III-1). Cada solução padrão era inserida individualmente num transportador e percorria sempre um mesmo trajecto até ao detector. A calibração resultou da injecção repetida de soluções padrão com concentrações crescentes.

As condições específicas de cada ensaio foram obtidas pela introdução da solução desejada no referido canal transportador. A mistura da amostra, intercalada em água, com esta solução transportadora era efectuada num reactor. Este reactor foi preparado numa configuração em malha, de forma a obter a melhor mistura para a menor dispersão. Para os ensaios com ajuste de força iónica o electrólito utilizado foi o sulfato de sódio, dado o anião SO_4^{2-} apresentar uma carga global de -2, diferente por isso da do ião principal (igual a -1).

As soluções injectadas na montagem de fluxo sofriam um processo de diluição contínua com a solução de transporte, vulgarmente designado por dispersão. A extensão dessa diluição afectava, de uma forma mais ou menos evidente, o valor de concentração a partir do qual o eléctrodo apresentava uma resposta linear e a sensibilidade dessa resposta analítica. Neste sentido, as unidades potenciométricas foram inicialmente caracterizadas em condições próximas às de estado estacionário através da utilização de um volume de amostragem igual a 300 μL e de um caudal igual a 2,5 mL min^{-1}. Apenas numa fase posterior se avaliou a influência destes parâmetros no comportamento dos eléctrodos.

Com os valores obtidos experimentalmente efectuou-se o traçado gráfico de curvas de calibração de acordo com as recomendações da IUPAC [84]. Esse traçado foi realizado utilizando um programa de computador, Microsoft Excel 2007. Os parâmetros das curvas de calibração avaliados foram o LIRL, o LD e o declive. Esses parâmetros foram calculados com base no traçado de, pelo menos, 4 curvas de calibração consecutivas ou intercaladas. A repetibilidade dos sinais analíticos, expressa aqui como o desvio padrão entre sinais registados, foi obtida a partir da leitura de 12 injecções seguidas de uma solução padrão de cloreto, com uma concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}. A reprodutibilidade foi obtida a partir do desvio padrão relativo (em %) da média dos potenciais de soluções padrão $1x10^{-3}$ mol L^{-1} obtidos em calibrações traçadas mediante as mesmas condições experimentais.

O tempo de resposta dos detectores tubulares está relacionado não apenas com as suas características de resposta mas também com as condições experimentais escolhidas para a montagem FIA, nomeadamente o caudal e o volume de injecção utilizados. Por este motivo, o tempo de resposta sugerido pela IUPAC foi aqui substituído pela frequência analítica (FA). Na prática, e também de acordo com as normas da IUPAC, determinou-se a frequência com que porções subsequentes de amostra podiam ser injectadas sem que a sua leitura fosse afectada por sinais precedentes. Os valores de frequência analítica apresentados ao longo

deste trabalho correspondem ao valor médio obtido para soluções padrão e/ou de amostra que podiam ser avaliadas ao longo de uma hora.

III.7. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH

Este estudo tem por objectivo a representação de diagramas de Reilley, que representa a variação dos valores de ΔE (mV), fornecidos pela célula potenciométrica, em função dos valores de pH de uma solução de ião principal. Foi considerado como intervalo operacional do eléctrodo aquele cujos valores de pH correspondiam a variações de sinal analítico que não iam além de ± 5 mV.

Procedeu-se ao aumento dos valores de pH da solução de ião principal até cerca de 11,0 unidades, seguindo-se o seu decréscimo até cerca de 2,0 unidades. Estas variações de pH foram obtidas por adição de pequenos volumes de uma solução de NaOH saturada e de H_2SO_4 concentrado, a um volume de solução de ião principal aproximadamente igual a 200,0 mL com uma concentração de $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}. A homogeneização da solução, cujo pH foi modificado, foi garantida com o auxílio de um agitador magnético.

Para o acompanhamento das variações de pH utilizou-se um eléctrodo de vidro combinado, previamente calibrado por intermédio de soluções tampão padronizadas com 10,0; 7,0; e 4,0 unidades de pH.

Para se proceder ao traçado dos diagramas de Reilley foi necessária uma ligeira adaptação na montagem FIA [97], cuja representação se faz na Figura III-6.

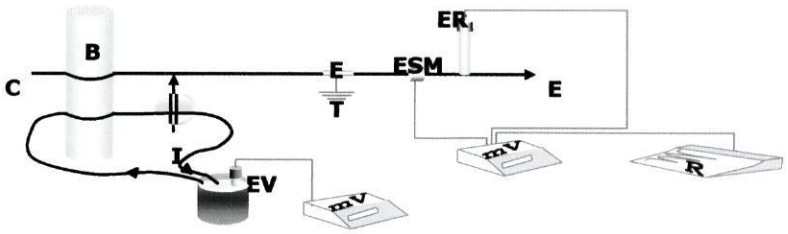


Figura III-6 Montagem FIA de baixa dispersão adaptada à avaliação da influência do pH no comportamento dos detectores tubulares. B: bomba peristáltica; I, válvula de injecção; C: canal de transporte da solução transportadora; ET: eléctrodo de terra; ESM: eléctrodo selectivo de MT; ER: eléctrodo de referência; E: esgoto; mV: decimilivoltímetro; R: registador; EV: eléctrodo de vidro.

Neste estudo foi injectado um volume de 200 μL da solução na qual se provocam variações de pH. O valor de potencial do pico indicado à sua passagem pelo detector foi representado

em função do pH da solução correspondente. De forma a evitar alterações na concentração por perda de elevados volumes da solução de medida, estabeleceu-se um circuito fechado igual ao representado na Figura III-5. A perda total de volume desta solução correspondia, por isso, à soma dos pequenos volumes intercalados em cada leitura.

III.8. AVALIAÇÃO DA SELECTIVIDADE DOS ELÉCTRODOS

O cálculo dos valores de coeficiente de selectividade $K^{pot}_{A,B}$ foi efectuado através do método das soluções separadas. Para isso, foram utilizadas quatro soluções padrão de concentrações compreendidas entre $2{,}0\times10^{-4}$ e $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}. O procedimento experimental aqui seguido foi semelhante ao utilizado para o traçado das curvas de calibração com a força iónica ajustada. A substituição, na equação II-4, dos valores determinados experimentalmente, permitiu o cálculo dos valores de $K^{pot}_{A,B}$ relativos às concentrações estudadas.

III.9. OPTIMIZAÇÃO DO SISTEMA

As condições experimentais do sistema FIA com o detector potenciométrico foram optimizadas antes de proceder à aplicação analítica dos detectores. Esta optimização teve por objectivo reduzir o consumo de amostra e aumentar a frequência analítica e a sensibilidade.

O primeiro parâmetro em estudo foi o ajuste da força iónica. Testaram-se soluções de sulfato de sódio com concentrações entre 1,0 e 0,010 mol L^{-1}.

Na montagem FIA utilizada os parâmetros da montagem com maior relevância no sinal analítico são o caudal e o volume de injecção. O efeito destes parâmetros foi avaliado através da injecção de soluções padrão de ião principal, com valores de concentração entre $1{,}0\times10^{-4}$ e $1{,}0\times10^{-2}$ mol L^{-1}. Neste estudo utilizaram-se volumes de injecção compreendidos entre 100 e 500 µL e caudais de 1,7, 2,5, 3,4 e 4,2 mL min^{-1}. Para cada uma das condições experimentais estudadas, foram registados os valores de declive, de LIRL, de coeficiente de correlação e de frequência analítica.

III.10. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras analisadas foram obtidas em diversos hipermercados e padarias locais da região Norte. Em cada um dos locais foram comprados os pães comercializados dos seguintes tipos: pão de trigo, pão integral, pão de centeio, pão de mistura, broa de milho,

pão sem sal, pão meio sal, pão-de-leite e pão de água. Os hipermercados onde foram colhidas estas amostras foram: Carrefour, Continente, Intermarché, Jumbo, Pingo-doce, e Froiz. Para cada um dos hipermercados foram colhidas amostras em três locais de venda ao público, localizados, sempre que possível, em três cidades diferentes. As padarias locais apresentavam fabrico próprio e localizavam-se em Gaia, Maia, Matosinhos, Paços de Ferreira e Porto. Ao longo deste trabalho a origem dos pães foi codificada.

Diversas amostras de pão foram também colhidas na região de Coimbra. Nesta colheita foram apenas incluídas padarias locais, com fabrico próprio. Na medida do possível, escolheram-se categorias de pão semelhantes às seleccionadas nas amostras referidas anteriormente. No entanto, foram introduzidas mais algumas com consumo significativo.

De cada uma das amostras recebidas foi retirada uma toma de 5 g e 2,5 g de pão, na regiões Norte e Coimbra, respectivamente. Esta toma foi obtida a partir de pão inteiro, previamente cortado em pequenos pedaços e escolhendo aleatoriamente os pedaços para cada toma até obtenção da massa desejada. Cada toma foi seca em estufa, a 105 ºC durante 1 h, pulverizada e transferida quantitativamente para um frasco de 500 mL. Adicionaram-se cerca de 450 mL de água ultra pura previamente fervida e colocou-se a mistura em rotação vertical automática (25 rotações por minuto) durante 1 h. A mistura ficou em repouso durante 24 h a 4 ºC, completou-se o volume e filtrou-se por gravidade em filtro de 0,45 µm.

III.11. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Para efectuar o doseamento de cloretos nas amostras de pão traçaram-se previamente curvas de calibração. As concentrações de cloreto nas amostras foram calculadas por interpolação nas respectivas curvas de calibração e expressas em teor de cloreto por 100 g de pão. O número de ensaios realizados para cada amostra foi, no mínimo, igual a três.

III.11.1. Análise Potenciométrica

O procedimento de doseamento das amostras foi iniciado pela calibração da célula de ISE entre 3,45 a 345,5 mg L^{-1}. O procedimento experimental utilizado para este efeito foi igual ao descrito em III.6. Para a análise potenciométrica da amostra foi seguido o mesmo procedimento experimental efectuado para leitura das soluções padrão. Através da equação de regressão linear da curva de calibração, foi possível fazer corresponder o potencial da solução problema à quantidade de ião principal presente. Os resultados das análises apresentados correspondem sempre à média de, pelo menos, três leituras. A precisão dos

resultados foi calculada por intermédio do desvio padrão correspondente.

III.11.2. Análise pelo Método de comparação

O método de comparação utilizado foi um método independente baseado em Fluxo Contínuo Segmentado (FCS) e utilizado nas análises de rotina efectuadas no Centro de Qualidade Hídrica (CQH) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

A designação de FCS advém do perfil de registo contínuo do sinal analítico de soluções e da intercalação de ar no interior do sistema. Designam-se por métodos contínuos aqueles em que a determinação da concentração da espécie a analisar é realizada sem interrupções sobre um fluxo líquido ou gasoso [111,112]. As amostras a analisar são sucessivamente introduzidas e com intervalos regulares, geralmente, num canal onde passa uma solução que pode conter um reagente que, eventualmente, se pretenda adicionar. Os métodos contínuos podem ainda ser divididos em dois tipos gerais: os segmentados e os não segmentados. Nos métodos contínuos segmentados as amostras são aspiradas sequencialmente e entre elas intercalam-se bolhas de ar que as separam ou segmentam o fluxo. Este processo inclui na maioria dos casos um ciclo de lavagem. As bolhas de ar intercaladas no sistema são retiradas antes de atingirem o detector, tal como indicado na Figura III-7 que representa a montagem utilizada neste método.

Uma montagem típica de FCS (Figura III-7) é semelhante à de um sistema FIA, apresentando um sistema de amostragem, uma unidade de bombagem, serpentinas de reacção, sistema de detecção contínua e sistema de recolha de tratamento de resultados. Estas montagens podem também apresentar um sistema de aquecimento – que consiste em banhos termostatizados ou em arames eléctricos que envolvem as serpentinas de modo a favorecer a reacção analítica – e sistemas de separação contínua – elemento opcional como extractores líquido-líquido, colunas de adsorção ou de permuta iónica, filtros, etc., que pode ser colocado antes das serpentinas de reacção de modo a remover espécies potencialmente interferentes.

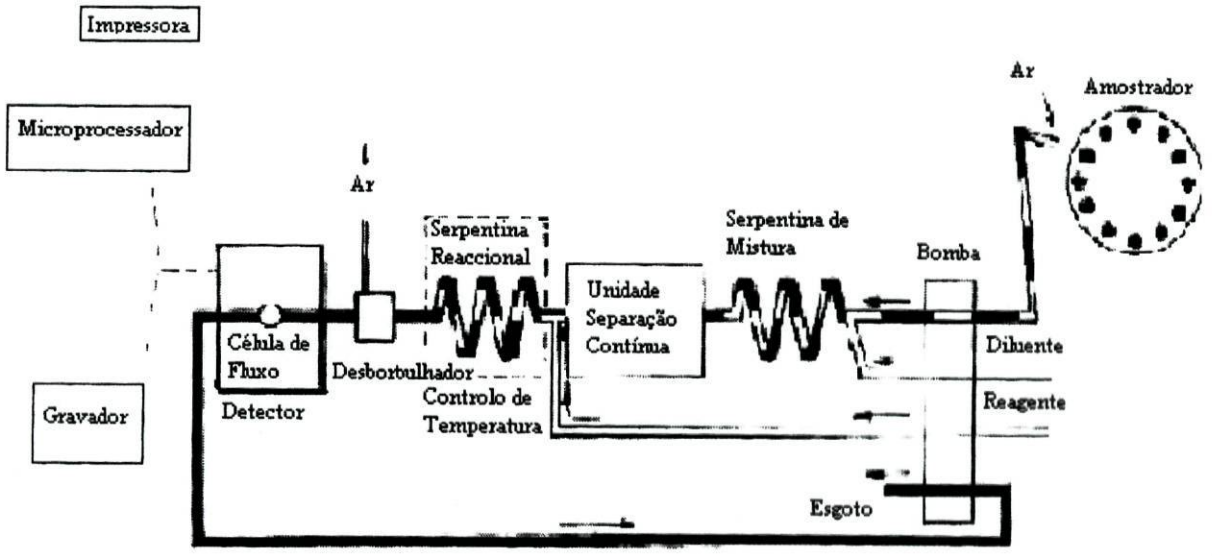


Figura III-7 Representação da Montagem de FCS usada no método de comparação.

O método de FCS utilizado para comparação foi baseado numa reacção colorimétrica. O tiocianato é libertado do tiocianato de mercúrio, através da retenção do mercúrio pelo ião cloreto para cloreto de mercúrio unionizado. Na presença do ião férrico, as formas de tiocianato libertadas coloram altamente o tiocianato férrico. A absorção deste complexo é medida a um comprimento de onda de 490 nm e está relacionada com a concentração de cloretos. Quando necessário, as amostras foram diluídas a metade da sua concentração com água. A calibração do método foi efectuada entre 5,00 a 80,0 mg L^{-1} de cloreto.

III.12. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE COMPARAÇÃO

Para a validação do método de comparação analisaram-se amostras de pão fortificadas pelo método de comparação e por um método de cromatografia iónica. Este último método é utilizado em rotina no CQH do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge – Delegação do Porto.

As amostras foram preparadas medindo 5 mL de extracto de pão sem cloreto e um volume rigoroso de solução padrão de cloreto para um balão volumétrico de 10 mL. O volume de balão foi preenchido até à marca com água. As concentrações finais obtidas estavam compreendidas entre 5 e 100 mg L^{-1}, valores de concentração utilizados para calibração do método.

O método cromatográfico baseou-se na injecção de 25 µL de soluções padrão ou de soluções de amostra no sistema. As aliquotas injectadas foram intercaladas numa fase móvel que atravessava o sistema a 1,0 mL min^{-1}. A calibração foi efectuada para concentrações de cloreto compreendidas entre $2{,}8 \times 10^{-5}$ e $1{,}7 \times 10^{-3}$ mg L^{-1}. A título de

informação complementar, efectuou-se também a análise das mesmas amostras pelo método potenciométrico e os resultados foram comparados de modo semelhante ao descrito anteriormente.

A comparação dos resultados de ambos os métodos foi expressa em termos de erro relativo percentual. Todos os cálculos foram efectuados através de folhas de cálculo criadas no Excel - Microsoft Office 2007.

III.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A avaliação estatística dos resultados foi realizada com o software SPSS 14 e com Microsoft Excel.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A aplicação de um método analítico em rotina deve permitir a análise de um elevado número de amostras por hora e deve ser capaz de fornecer resultados precisos e exactos. Em termos práticos, estes requisitos podem ser conseguidos quando o detector, associado a FIA, apresenta uma resposta rápida e elevadas sensibilidade e selectividade.

O tempo de resposta é uma característica específica de cada detector e é um parâmetro fundamental para a obtenção de uma elevada frequência analítica em FIA. Dado que as leituras realizadas em linha não atingem o estado estacionário, a brevidade da resposta pode ser conseguida mediante a alteração de algumas variáveis experimentais. Na prática, o tempo de contacto entre o analito e o detector é constante num dado sistema e depende, entre outros, do volume injectado, do caudal das soluções e da configuração/dimensão do sistema de detecção.

A redução do volume de injecção e o aumento do caudal podem originar um aumento de frequência analítica por redução do troço de amostra e do tempo de contacto com o detector. A principal desvantagem destas condições é a redução da sensibilidade, já que o tempo de contacto com o detector diminui, reduzindo a intensidade de cada sinal medido. A selectividade poderá estar também comprometida nestas condições.

A configuração tubular origina uma baixa perturbação no troço de amostra que atravessa o detector, permitindo por isso elevadas frequências analíticas. Quando comparado com sistemas sensores equivalentes em configuração convencional, a superfície de contacto com o analito é mais reduzida, o que poderá condicionar a sensibilidade do método. De forma

oposta, uma superfície do contacto demasiado elevada poderá conduzir a uma saturação do sinal e a uma possível redução da intensidade da medida analítica ou dos limites de detecção.

Mediante as indicações anteriores, parece sensato encontrar as condições experimentais mais adequadas para cada método de forma experimental. Neste sentido, o presente estudo descreve a construção e avaliação de eléctrodos tubulares com diferentes comprimentos. Este estudo é feito em sistemas FIA, mantendo constantes todas as condições operacionais. A optimização da resposta analítica é efectuada antes de aplicar as unidades que oferecem as melhores características de resposta à análise de pão.

IV.2. SELECÇÃO DO COMPRIMENTO DO ELÉCTRODO

A escolha de um eléctrodo com comprimento adequado para a obtenção de frequências analíticas e sensibilidades maiores baseou-se na comparação das características operacionais dos diversos eléctrodos. Estas características foram obtidas a partir de curvas de calibração, efectuadas de acordo com o indicado na secção III.6.1, usando soluções aquosas de cloreto entre $1{,}0\times10^{-4}$ e $1{,}0\times10^{-2}$ mol L^{-1}. A solução de transporte foi uma solução de Na_2SO_4 0,1 mol L^{-1}, o volume de injecção foi 300 µL e o caudal 2,5 mL min^{-1}.

Os valores médios dos parâmetros de calibração obtidos foram calculados com base em quatro ensaios e encontram-se indicados na Tabela IV-1. Os fiagramas típicos obtidos para os eléctrodos de vários comprimentos foram representados nas Figuras IV-1 e IV-2.

Tabela IV-1 Características gerais de funcionamento dos diferentes eléctrodos selectivos de cloreto.

Características	**Comprimento do Eléctrodo (cm)**			
	1,0	**1,5**	**3,0**	**6,0**
LD (mol L^{-1})	$4{,}0\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$
(mg L^{-1})	1,42	1,42	1,42	1,42
LIRL (mol L^{-1})	$1{,}0\times10^{-4}$	$1{,}0\times10^{-4}$	$1{,}0\times10^{-4}$	$1{,}0\times10^{-4}$
(mg L^{-1})	3,55	3,55	3,55	3,55
Declive (mV década^{-1})	56,55±0,43	55,98±0,83	56,24±0,28	52,70±0,53
R^2	0,999±0,000	0,998±0,002	0,998±0,001	0,998±0,001
Repetibilidade (mV)	72,88±0,23	65,23±0,58	67,75±0,65	63,53±0,99
Reprodutibilidade (mV)	0,31%	0,89%	0,97%	1,55%
FA (injecções h^{-1})	≈56	≈54	≈53	≈50

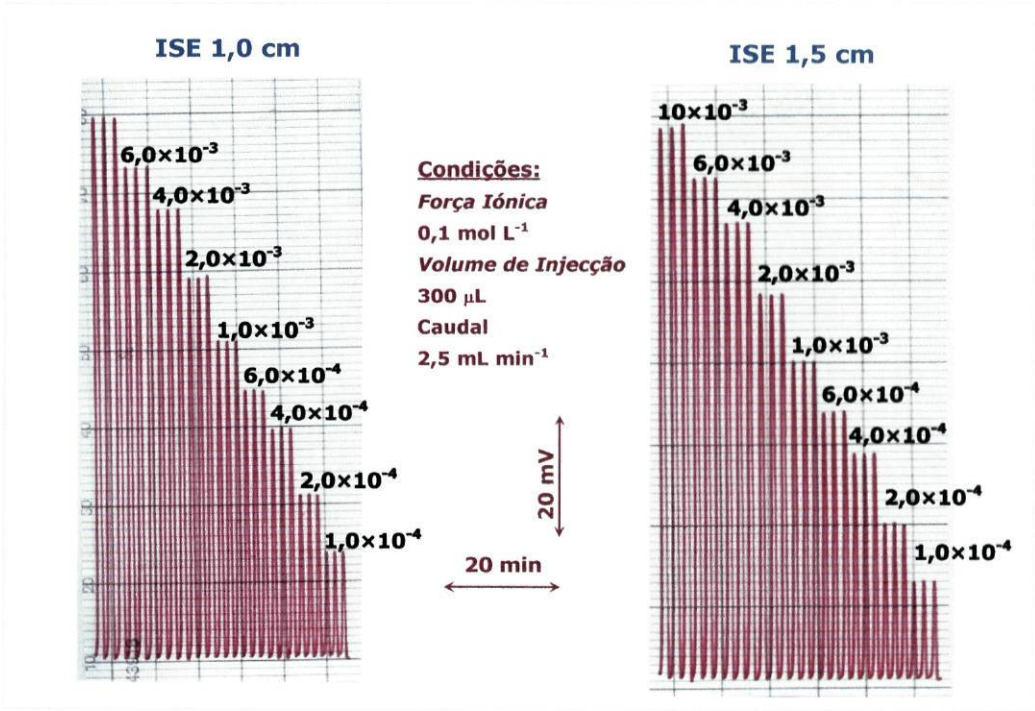


Figura IV-1 Registos típicos das curvas de calibração dos eléctrodos tubulares com 1,0 e 1,5 cm de comprimento e as concentrações das soluções padrão correspondentes (em mol L^{-1}).

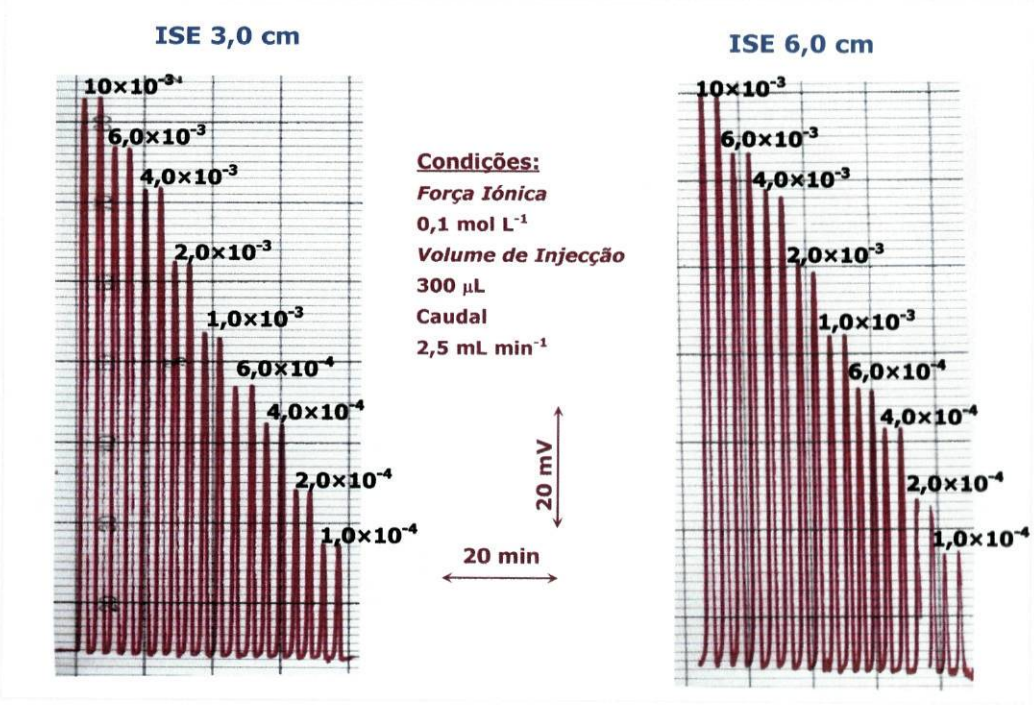


Figura IV-2 Registos típicos das curvas de calibração dos eléctrodos tubulares com 3,0 e 6,0 cm de comprimento e as concentrações das soluções padrão correspondentes (em mol L^{-1}).

De uma forma geral, os eléctrodos apresentaram um comportamento semelhante no que diz respeito a LD e a LIRL (tabela IV 1). Os valores de declive foram semelhantes para os eléctrodos com 1,0; 1,5 e 3,0 cm de comprimento, apresentando valores muito próximos aos previstos pela equação de Nernst. Nas condições ensaiadas o eléctrodo de maior comprimento registou um declive ligeiramente inferior.

Os ISEs permitiram a leitura analítica de quase uma amostra por minuto. Como seria de esperar, o aumento do comprimento do detector originou uma redução na frequência analítica. Esta redução não foi muito significativa, o que parece indicar que os eléctrodos apresentam um tempo de resposta bastante reduzido, não sendo afectado pelo aumento de tempo de contacto com o detector em virtude do aumento da sua superfície.

As características de repetibilidade evidenciadas pelos eléctrodos foram adequadas, com desvios relativos inferiores a 1%. O ensaio realizado está representado na Figura IV-3, correspondente à injecção consecutiva de uma solução padrão de $6{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1} com o ISE de 1,0 cm de comprimento. Os restantes detectores evidenciaram características de repetibilidade equivalentes aquando do traçado das curvas de calibração correspondentes, pelo que este ensaio não foi repetido com todas as unidades.

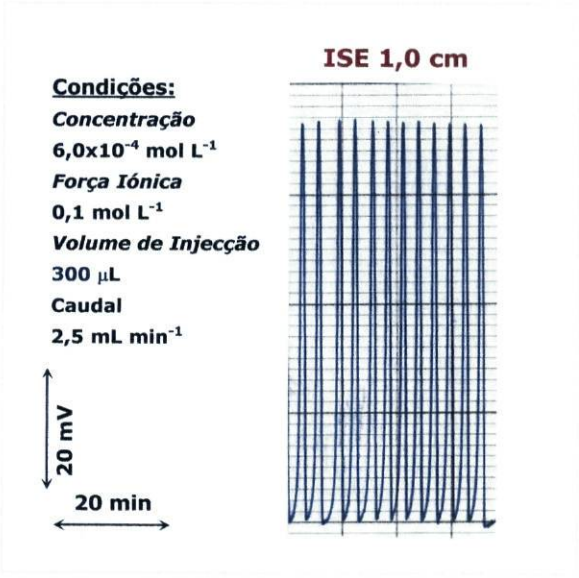


Figura IV-3 Registo da repetibilidade do sinal analítico para o ISE de 1,0 cm.

Apesar das características gerais de funcionamento encontradas serem semelhantes para os eléctrodos de comprimentos diferentes, a unidade escolhida foi a de 1,0 cm de comprimento. Este eléctrodo permitiu obter a maior frequência analítica, tornando o método

mais expedito. Para além da rapidez, a maior frequência analítica origina também uma redução na emissão de efluentes e, consequentemente, uma redução no custo que lhe está associado.

IV.3. EFEITO DO PH

Para a avaliação do efeito do pH nos valores de potencial do eléctrodo selectivo a cloretos seguiram-se os procedimentos descritos na secção III.7. A solução padrão ensaiada apresentava uma concentração de $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, valor incluído na zona de resposta linear deste eléctrodo. O valor de pH da solução foi sendo alterado pela adição de pequenas quantidades de solução de NaOH saturada e de H_2SO_4 concentrado. A escolha destas soluções teve como base não introduzir iões estranhos na solução cujo pH se pretendia variar: o anião SO_4^{2-} encontrava-se nas soluções por intermédio do transportador e o catião Na^+ estava presente na solução padrão através da dissolução do cloreto de sódio.

De acordo com os diagramas de Reilley representados, estima-se que a região operacional de pH se localize entre 2 e 11 unidades (Figura IV-4). De uma forma geral, o potencial da solução permaneceu invariável na região ácida e subiu ligeiramente para valores de pH superiores a 10. Este comportamento deverá ser resultado da interacção dos aniões hidróxido com a prata. Nesta gama de valores de pH a concentração de hidróxido é bastante elevada, podendo interferir com o equilíbrio de solubilidade estabelecido entre o catião Ag^+ e o anião Cl^-.

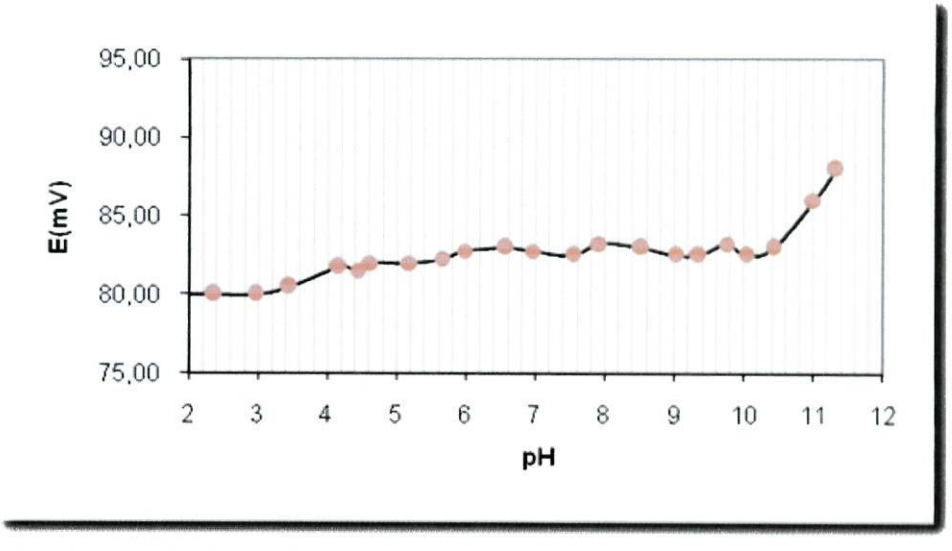


Figura IV-4 Diagrama de Reilley para uma concentração de cloreto igual a $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}.

A região de pH operacional foi bastante alargada parecendo indicar que qualquer ajuste de pH das soluções poderá ser uma medida desnecessária. Os valores de pH dos extractos de pão não apresentaram valores de pH fora deste intervalo, apresentando caracteristicamente um valor de pH de 6. Neste sentido, optou-se por prosseguir com ensaios subsequentes utilizando apenas o ajustador de força iónica.

IV.4. CARACTERÍSTICAS DE SELECTIVIDADE

No sentido de avaliar a extensão da interferência de alguns compostos no comportamento dos detectores procedeu-se à determinação dos respectivos coeficientes de selectividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$. O método utilizado foi o das soluções separadas, de acordo com o indicado na secção III.6. Escolheram-se concentrações de cloreto e de interferente de $4{,}0x10^{-4}$, $1{,}0x10^{-3}$, $4{,}0x10^{-3}$ e $1{,}0x10^{-2}$ mol L^{-1}, valores incluídos na zona de resposta linear dos eléctrodos.

As espécies estudadas foram o brometo, o iodato, o iodeto, o nitrato, o nitrito e o salicilato. Estas espécies seriam capazes de interferir com a resposta potenciométrica, na medida em que participam em equilíbrios de solubilidade com a prata. A escolha destas espécies em concreto decorreu da sua possível interferência por reacção com a prata, na sequência dos respectivos valores de produto de solubilidade (Tabela IV-2), ou das espécies que originaram interferências em trabalhos similares sobre pão ou sobre eléctrodos selectivos.

Tabela IV-2 Valores de produto de solubilidade para alguns sólidos de prata [114].

Anião	Carga do anião	Sólido	K_{PS}
Brometo	-1	AgBr	$5{,}0x10^{-13}$
Cloreto	-1	AgCl	$1{,}7x10^{-10}$
Iodato	-1	$AgIO_3$	$3{,}1x10^{-8}$
Iodeto	-1	AgI	$8{,}3x10^{-17}$
Nitrato	-1	$AgNO_3$	—
Nitrito	-1	$AgNO_2$	—
Salicilato	-1	AgSal	—

Perante as condições experimentais estabelecidas, os valores de $K_{A,B}^{pot}$ encontrados para o eléctrodo foram os indicados na Tabela IV-3. Sempre que possível, utilizaram-se os sais de sódio destes aniões na preparação das soluções de interferentes. Este procedimento teve por objectivo não introduzir outras espécies iónicas em solução, além das presentes.

Tabela IV-3 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica calculados.

Interferente	Concentração (mol L^{-1})	log $K^{pot}_{A,B}$
Brometo	$4x10^{-4}$	0,14±0,02
	$1x10^{-3}$	0,23±0,02
	$4x10^{-3}$	0,32±0,03
	$1x10^{-2}$	0,41±0,04
Iodato	$4x10^{-4}$	-0,56±0,01
	$1x10^{-3}$	-0,41±0,59
	$4x10^{-3}$	-1,51±0,03
	$1x10^{-2}$	-1,77±0,04
Iodeto	$4x10^{-4}$	0,15±0,03
	$1x10^{-3}$	0,19±0,01
	$4x10^{-3}$	0,27±0,02
	$1x10^{-2}$	0,34±0,05
Nitrato	$4x10^{-4}$	-1,17±0,01
	$1x10^{-3}$	-1,57±0,01
	$4x10^{-3}$	-2,17±0,01
	$1x10^{-2}$	-2,56±0,01
Nitrito	$4x10^{-4}$	-1,16±0,01
	$1x10^{-3}$	-1,54±0,01
	$4x10^{-3}$	-2,15±0,01
	$1x10^{-2}$	-2,55±0,01
Salicilato	$4x10^{-4}$	-1,08±0,02
	$1x10^{-3}$	-1,46±0,02
	$4x10^{-3}$	-2,00±0,02
	$1x10^{-2}$	-2,34±0,01

A ordem relativa de interferência para o eléctrodo de 1,0 cm foi Nitrato ≈ Nitrito < Salicilato < Iodato < Iodeto < Brometo. Este comportamento pode ser confirmado facilmente no gráfico representado na Figura IV-5. O registo obtido pode ser explicado mediante a extensão dos equilíbrios de solubilidade estabelecidos entre a prata e cada um dos aniões estudados como espécies interferentes. Quanto mais extensa a "formação" de sólido com o interferente, maior a interferência na reposta potenciométrica.

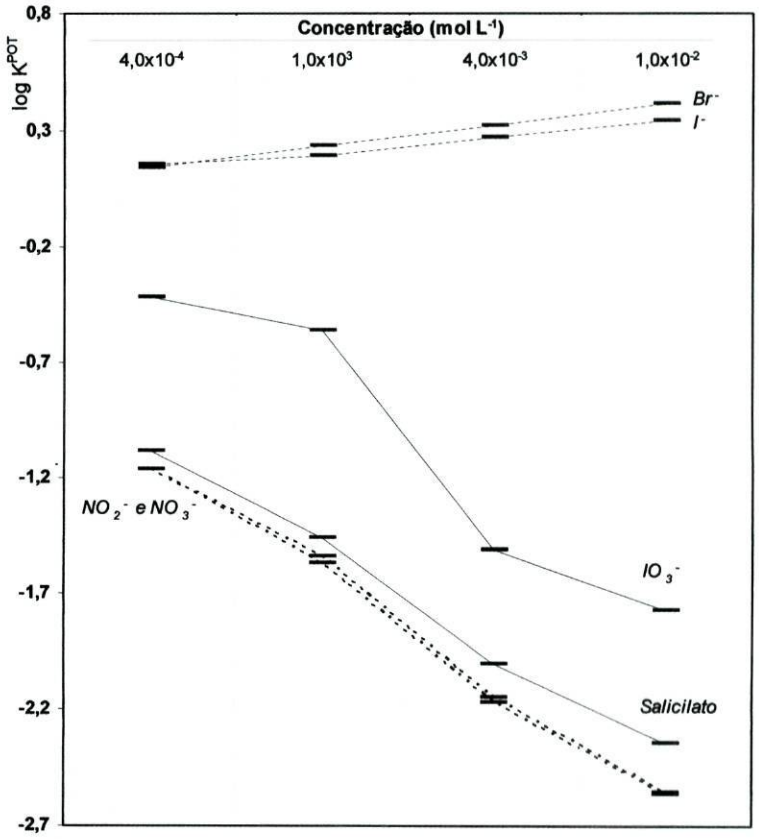


Figura IV-5 Representação gráfica dos coeficientes de selectividade K^{POT}.

IV.5. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

No sentido de optimizar as condições experimentais do sistema FIA para análise de amostras comerciais, procedeu-se inicialmente ao estudo da influência da força iónica da solução de transporte, do volume de amostragem e do caudal nos registos potenciométricos obtidos. Este estudo foi efectuado de acordo com o descrito em II.6.

A solução de transporte foi sempre sulfato de sódio. Esta solução foi preparada com concentrações diferentes, no sentido de obter valores diferentes de força iónica. Os valores de força iónica estudados foram 0,010; 0,10 e 1,0 mol L^{-1}. As representações típicas dos fiagramas obtidos foram representadas nas Figuras IV-6 e IV-7.

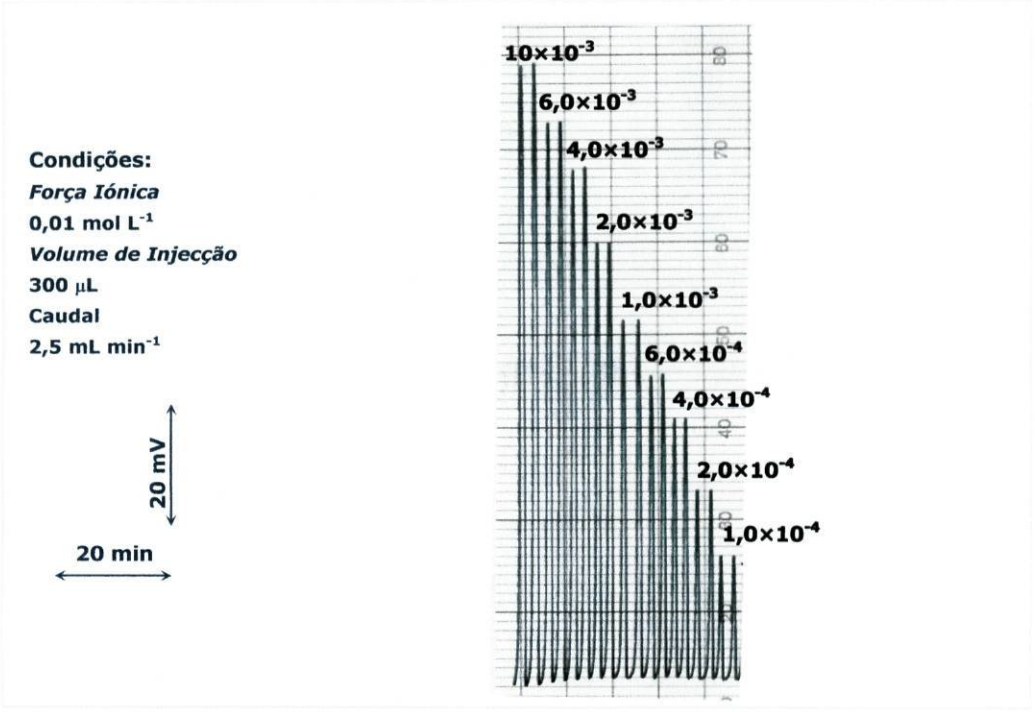


Figura IV-6 Registo típico de uma curva de calibração do eléctrodo tubular com 1,0 cm de comprimento e as concentração das soluções padrão correspondentes (concentrações em mol L^{-1}) para soluções de força iónica 1,0 mol L^{-1}.

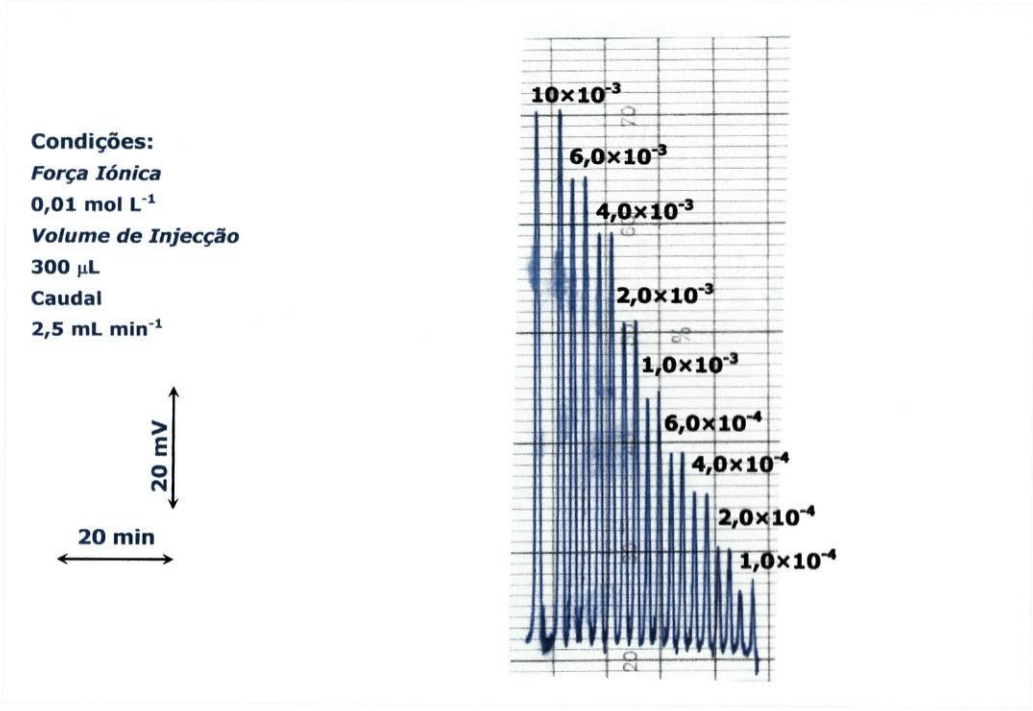


Figura IV-7 Registo típico de uma curva de calibração do eléctrodo tubular com 1,0 cm de comprimento e as concentração das soluções padrão correspondentes (concentrações em mol L^{-1}) para soluções de força iónica 0,01 mol L^{-1}.

As características gerais de funcionamento dos eléctrodos obtidas neste estudo estão indicadas nas Tabelas IV-4 e IV-5. Os resultados obtidos parecem indicar que a concentração do ajustador de força iónica exerce uma influência significativa nas características de resposta dos eléctrodos, variando os valores de declive entre 46,5 e 53,9 mV década^{-1}. De acordo com os resultados obtidos, a força iónica seleccionada foi a de 0,1 mol L^{-1}.

Tabela IV-4 Características gerais de funcionamento do eléctrodo selectivo de cloreto de 1,0 cm para 0,01, 0,1 e 1,0 mol L^{-1} de força iónica.

Características		**Força iónica (mol L^{-1})**		
		0,01	**0,1**	**1,0**
LD	(mol L^{-1})	4,0x10^{-5}	4,0x10^{-5}	4,0x10^{-5}
	(mg L^{-1})	1,42	1,42	1,42
LIRL	(mol L^{-1})	1,0x10^{-4}	1,0x10^{-4}	1,0x10^{-4}
	(mg L^{-1})	3,45	3,45	3,45
Declive (mV década^{-1})		46,47±0,53	56,55±0,43	53,92±0,23
R^2		0,991±0,001	0,999±0,000	0,999±0,000
FA (injecções h^{-1})		≈25	≈56	≈22

O volume de amostragem e o caudal da solução de transporte têm uma influência significativa na dispersão global da amostra, alterando a resposta do detector. Para esse estudo utilizaram-se volumes de amostragem de 100, 200, 300, 450 e 550 µL e valores de caudal de 1,7, 2,5, 3,4 e 4,2 mL min^{-1}. Para a determinação do declive injectaram-se no sistema nove soluções padrão de cloreto com concentrações entre 1,0x10^{-4} e 1,0x10^{-2} mol L^{-1}.

As características médias de resposta do eléctrodo face ao caudal e ao volume de injecção estão indicados nas tabelas IV-5 e IV-6. Estes valores médios foram calculados com base em quatro ensaios. Os registos típicos obtidos com o ISE de cloreto de 1,0 cm foram representados nas Figuras IV-8 a IV-12.

Tabela IV-5 Características gerais de funcionamento do eléctrodo, selectivo a cloreto, obtidas em solução aquosa para diferentes caudais.

Caudal (mL min^{-1})	Declive (mV $década^{-1}$)	FA (h^{-1})
1,7	57,13±0,36	≈40
2,5	56,55±0,43	≈56
3,4	57,36±0,91	≈80
4,2	56,54±0,17	≈85

Tabela IV-6 Características gerais de funcionamento do eléctrodo, selectivo a cloreto, obtidas em solução aquosa diferentes volumes de injecção.

Volume de Injecção (µL)	Declive (mV $década^{-1}$)	FA (h^{-1})
100	55,67±0,73	≈72
200	56,72±0,30	≈61
300	56,55±0,43	≈56
450	56,52±0,09	≈45
550	56,24±0,51	≈43

Relativamente à influência do caudal, os resultados da Tabela IV-5 apontam para valores de sensibilidade muito semelhantes entre os diversos valores estudados. Os valores estiveram todos muito próximos dos 59 mV $década^{-1}$ previstos pela equação de Nernst. A diferença em destaque foi a frequência analítica, com aumentos da ordem dos 100 % quanto o caudal passou de 1,7 para 3,5 mL min^{-1}. Este resultado pode ser verificado por comparação das Figuras IV-8 e IV-9. decorre do aumento do caudal correspondente, um aumento da mesma ordem de grandeza.

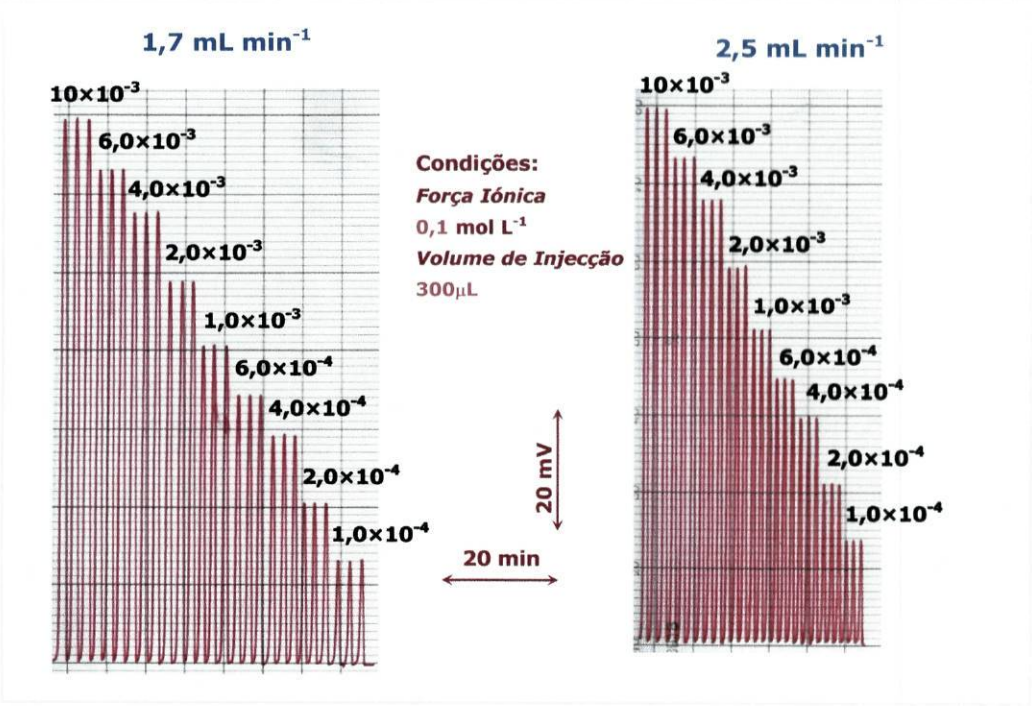


Figura IV-8 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com caudais de 1,7 e 2,5 mL min^{-1}.

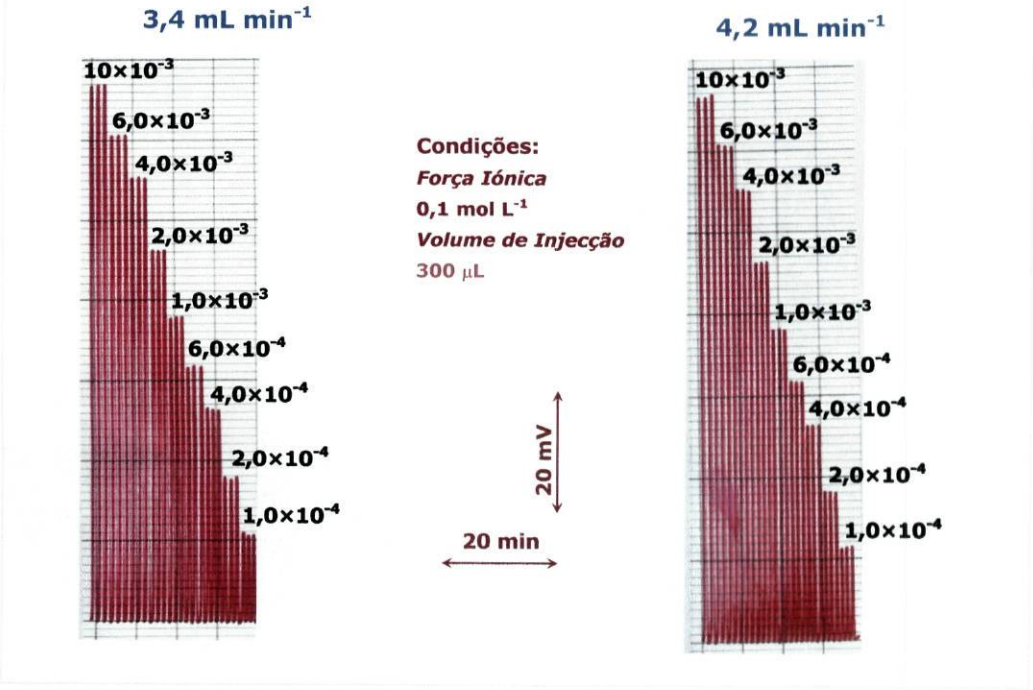


Figura IV-9 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com caudais de 3,4 e 4,2 mL min^{-1}.

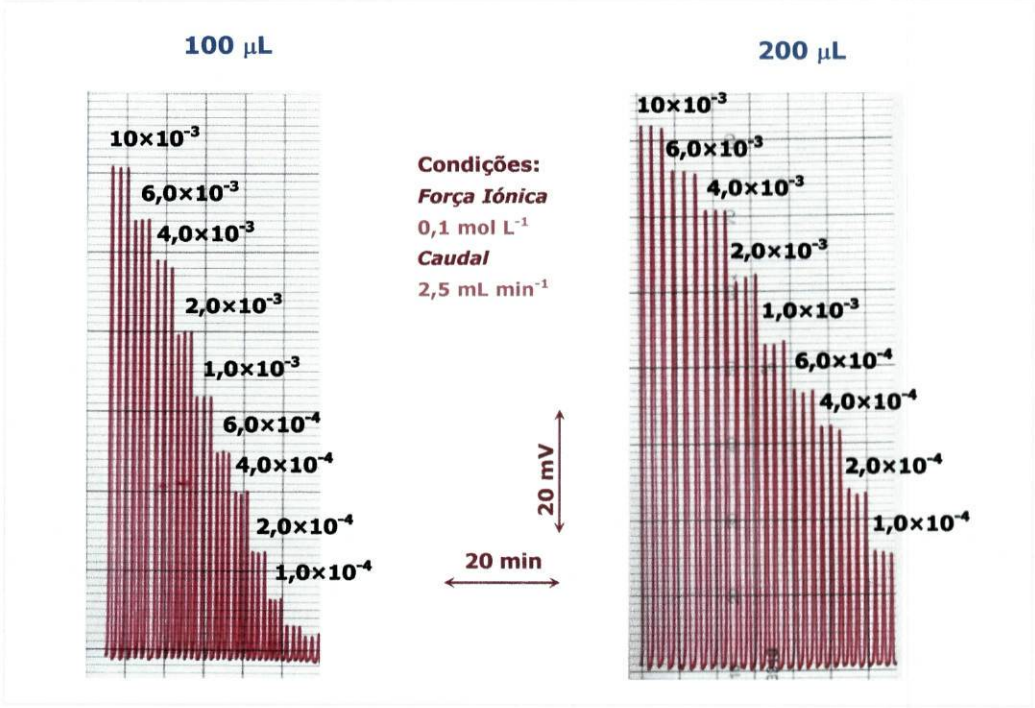


Figura IV-10 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com volumes de injecção de 100 e 200 µL

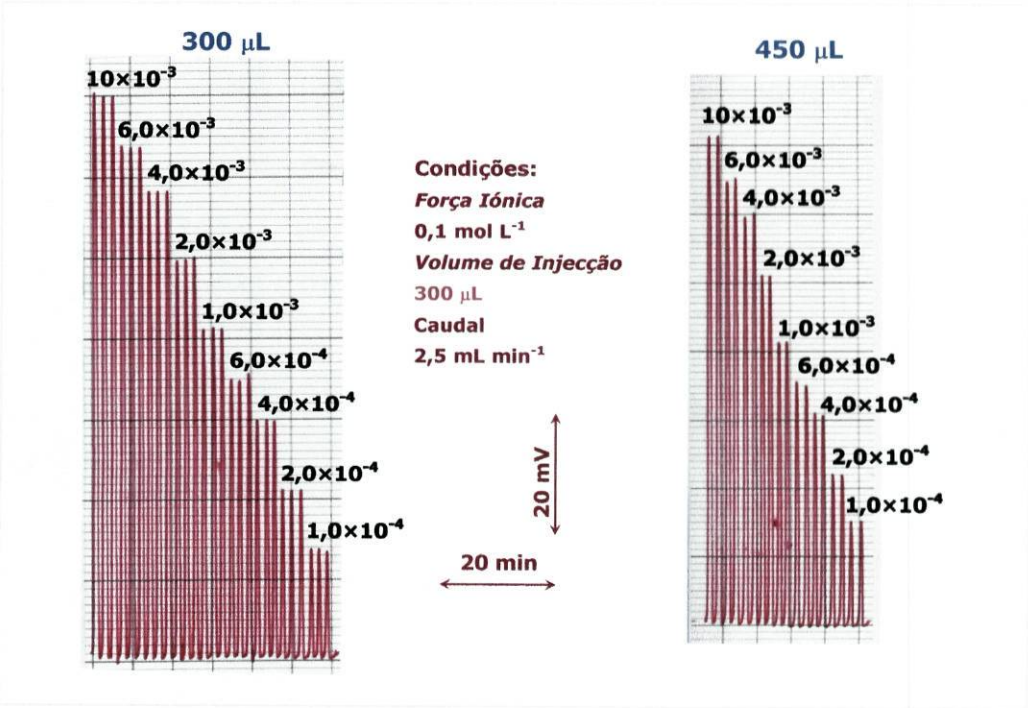


Figura IV-11 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com volumes de injecção de 300 e 450 µL

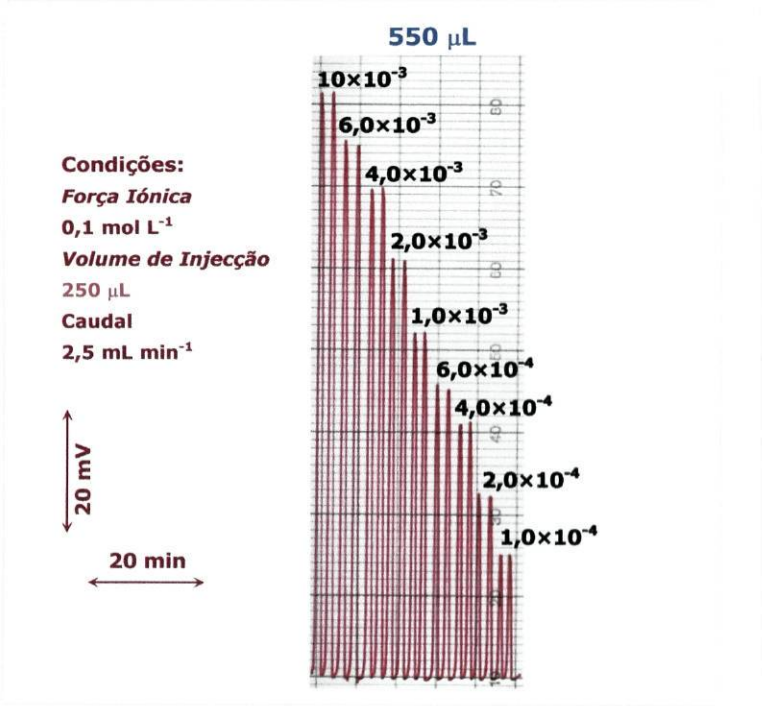


Figura IV-12 Registos típicos para os ISEs de cloreto, efectuados com volumes de injecção de 550 µL

Relativamente ao volume de injecção, apenas a injecção de 100 µL de amostra conduziu a declives ligeiramente inferiores (Tabela IV-6). Todos os outros originaram valores semelhantes, da ordem dos 56 - 57 mV década^{-1}. Estes resultados parecem indicar que a utilização de um volume de cerca de 200 µL é garantidamente suficiente para a obtenção de uma sensibilidade adequada. Para valores mais elevados verifica-se um decréscimo da frequência analítica significativo (Figura IV-13). Este decréscimo está, ainda, associado a um maior consumo de amostra e, por consequência, à emissão de maior quantidade de efluentes.

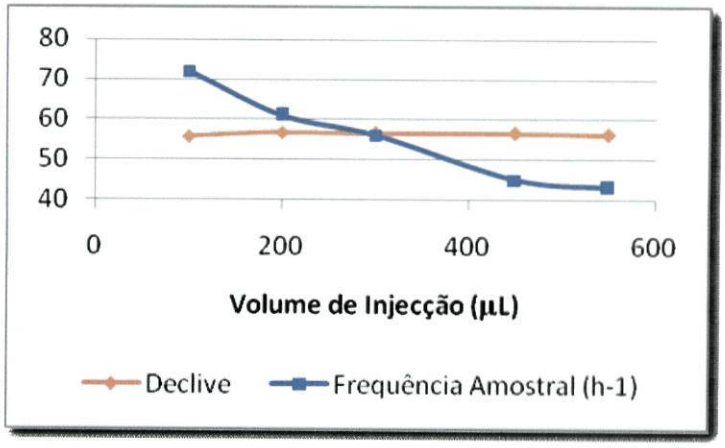


Figura IV-13 Variação do Declive e Frequência Amostral em função do volume de injecção.

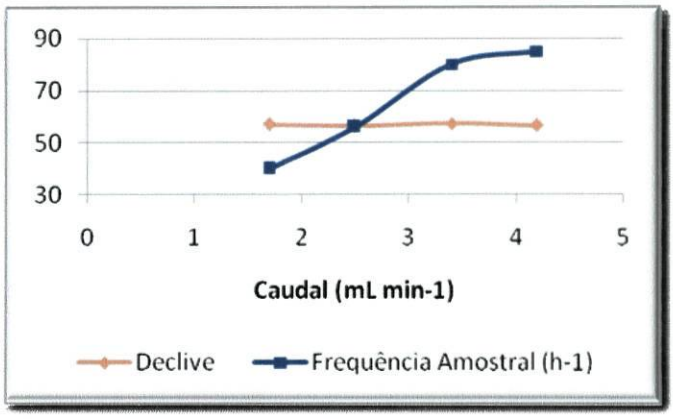


Figura IV-14 Variação do Declive e Frequência Amostral em função do caudal.

Como um compromisso entre a frequência analítica e a sensibilidade, optou-se pelo volume de injecção de 300 µL (Figura IV-14). Esta estratégia reduziu também o volume de efluentes produzidos, em volume e em complexidade. A carga orgânica e inorgânica de pão nos efluentes é bastante reduzida e os custos inerentes à preparação de amostra e ao tratamento de efluentes poderão ser também minimizados. Considerando que as condições seleccionadas após optimização foram as utilizadas para a caracterização do desempenho dos vários detectores de configuração tubular, não se procedeu à re-caracterização dos mesmos. O sistema desenvolvido foi, então, aplicado na análise de amostras de pão.

IV.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO POTENCIOMÉTRICO

Dois dos objectivos deste trabalho foram aplicar o método desenvolvido a um elevado número de amostras e comparar os resultados obtidos com os fornecidos por um método independente. Este método independente deveria ser expedito e não demasiado caro, na medida em que o número de amostras a analisar era demasiado elevado. Neste sentido, optou-se pela utilização de um método de FCS já utilizado rotineiramente no CQH do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Delegação do Porto.

Numa fase inicial, esta comparação foi baseada em "amostras padrão", constituídas por extractos de pão sem sal fortificadas com concentrações conhecidas de cloreto. As concentrações escolhidas distribuíram-se ao longo de todo o intervalo de calibração utilizado. Os valores obtidos encontram-se indicados na Tabela IV-7.

Tabela IV-7 Concentrações de cloreto nas soluções de "amostras padrão", analisadas pelos métodos de cromatografia iónica (CI), de FCS e potenciométrico em FIA, e erros relativos (ER) correspondentes com relação à CI.

Amostras	CI (mg/L)	FCS		FIA	
		(mg/L)	Er (%)	(mg/L)	Er (%)
Pão Especial sem sal	5,37	3,59	-33,1	4,69	30,5
Controlo (25mL de amostra + 25mL de água)	1,91	2,30	20,4	2,97	29,0
"Amostra Padrão" 1 (25mL de amostra + 25mL de padrão de concentração 20 mg/L)	12,87	11,05	-14,1	10,86	-1,7
"Amostra Padrão" 2 (25mL de amostra + 25mL de padrão de concentração 40 mg/L)	21,48	21,05	-2,0	20,92	-0,6
"Amostra Padrão" 3 (25mL de amostra + 25mL de padrão de concentração 60 mg/L)	31,24	31,13	-0,4	31,3	0,5
"Amostra Padrão" 4 (25mL de amostra + 25mL de padrão de concentração 80 mg/L)	41,21	41,22	0,0	40,85	-0,9
"Amostra Padrão" 5 (25mL de amostra + 25mL de padrão de concentração 100 mg/L)	50,75	50,78	0,1	50,13	-1,3
"Amostra Padrão" 6 (25mL de amostra + 25mL de padrão de concentração 120 mg/L)	61,58	62,92	2,2	61,54	-2,2
"Amostra Padrão" 7 (25mL de amostra + 25mL de padrão de concentração 140 mg/L)	73,32	74,80	2,0	71,02	-5,1
"Amostra Padrão" 8 (25mL de amostra + 25mL de padrão de concentração 160 mg/L)	83,05	85,58	3,0	81,41	-4,9

Considerando que as amostras em estudo iriam ser analisadas em paralelo pelos método FCS e potenciométrico em FIA, considerou-se como valor verdadeiro o resultado obtido pelo método de CI, cuja gama de trabalho varia entre 1,0 e 60 mg/L. As amostras fora da gama de trabalho em causa foram diluídas rigorosamente.

Os resultados obtidos indicam que, para valores inferiores a 20 mg/L, os erros relativos, quer para o FCS, quer para FIA, são muito elevados. Neste sentido, os valores de concentração encontrados nesta gama poderão não ser exactos. Para valores superiores, os erros relativos obtidos apresentam como valor absoluto máximo 4,9 %. A correlação entre os métodos FCS e potenciométrico em FIA pode ser confirmada pelas correlações representadas na Figura IV-15. Os valores de declive são próximos da unidade e o coeficiente de correlação também. Os resultados obtidos confirmam, por isso, a viabilidade

de aplicação de ambos os métodos no controlo de rotina de cloretos em pão.

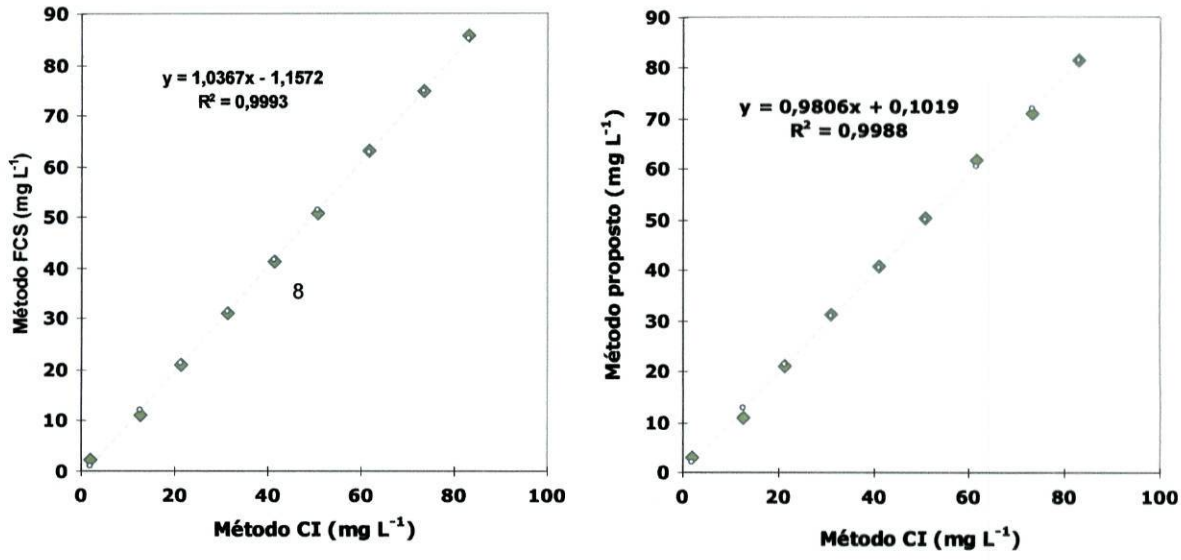


Figura IV-15 Regressão entre os dois métodos utilizados na análise de pão

IV.7. APLICAÇÃO ANALÍTICA

Neste trabalho consideraram-se amostras de pão de diferentes categorias. As categorias consideradas foram as indicadas na legislação [1] e as que, ao mesmo tempo, se encontravam disponíveis no mercado. As amostras foram adquiridas em diferentes hipermercados e em algumas padarias locais da região Norte e de várias freguesias de Coimbra.

Nas Tabelas IV-8 e IV-9 estão distribuídos os valores da variável estatística em frequências simples e acumuladas, separadas pelas regiões em estudo. As frequências absolutas indicam o número de vezes que cada tipo de pão se repete, assim, pode ver-se que foram analisados 2 pães sem sal na região Norte e 3 pães de cereais em Coimbra. A frequência relativa (%) exprime o número de vezes que o determinado tipo de pão é observado face ao total de observações. Pode ver-se que 16% dos pães colhidos são de trigo na região Norte e 27,5% em Coimbra.

Os valores de frequência revelam que os pães sem sal e os de meio sal são os de menor produção nas padarias tradicionais ou hipermercados, tanto na região de Coimbra como na região Norte. Em Coimbra verifica-se uma elevada dispersão amostral, com pães especiais muito diversificados.

Tabela IV-8 Frequência amostral e percentagem dos vários tipos de pão da Região Norte.

Tipo de Pão	Frequência (N)	Percentagem (%)
Pão de trigo	19	16,0
Pão integral	19	16,0
Pão de centeio	17	14,3
Pão de mistura	18	15,1
Broa de Milho	13	10,9
Pão sem sal	2	1,7
Pão meio sal	7	5,9
Pão-de-leite	10	8,4
Pão de água	14	11,8
Total	119	100,0

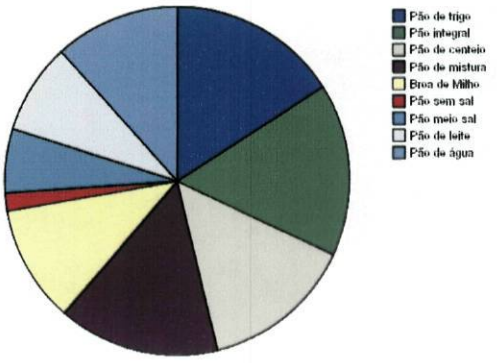
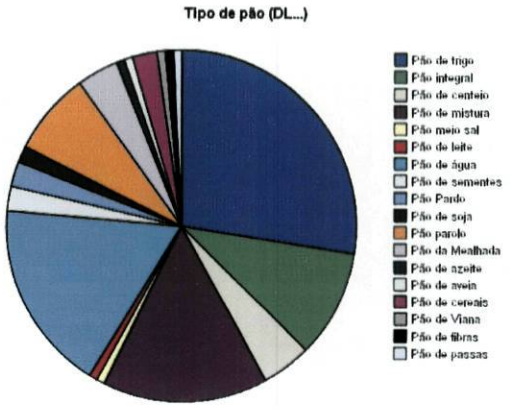


Tabela IV-9 Frequência amostral e percentagem dos vários tipos de pão de Coimbra.

Tipo de Pão	Frequência (N)	Percentagem (%)
Pão de trigo	36	27,5
Pão integral	13	9,9
Pão de centeio	6	4,6
Pão de mistura	20	15,3
Pão meio sal	1	0,8
Pão-de-leite	1	0,8
Pão de água	23	17,6
Pão de sementes	3	2,3
Pão Pardo	3	2,3
Pão de soja	2	1,5
Pão parolo	10	7,6
Pão da Mealhada	5	3,8
Pão de azeite	1	0,8
Pão de aveia	1	0,8
Pão de cereais	3	2,3
Pão de Viana	1	0,8
Pão de fibras	1	0,8
Pão de passas	1	0,8
Total	131	100,0



Os valores de concentração obtidos encontram-se indicados na Tabela IV-10. Estes valores, e alguns outros expressos nas tabelas seguintes em mg/L, correspondem à concentração de cloretos nos extractos de pão analisados. Esta concentração corresponde, sempre, ao valor de mg de cloreto em 5 g e 2,5 g de pão, nas regiões Norte e de Coimbra, respectivamente. O teor de cloretos em 100 g de pão é, por isso, obtido multiplicando cada concentração indicada pelo factor 10 e 20, nas regiões Norte e de Coimbra, respectivamente.

Tabela IV-10 Valores de concentração de cloretos nas amostras analisadas.

Ceq Na (mg/L)	Na (mg/L)	ER (%)	Ceq Na (mg/L)	Na (mg/L)	ER (%)	Ceq Na (mg/L)	Na (mg/L)	ER (%)	Ceq Na (mg/L)	Na (mg/L)	ER (%)	Ceq Na (mg/L)	Na (mg/L)	ER (%)
5,5	5,3	3,77	42,5	43,5	2,30	49,3	51,6	4,46	75,3	76,7	1,83	102,1	105,7	3,41
7,2	7,4	2,70	42,5	42,4	0,24	49,4	52,0	5,00	75,4	79,5	5,16	102,3	109,4	6,49
8,2	8,2	0,00	42,8	42,9	0,23	50,0	48,7	2,67	76,4	83,8	8,83	102,5	112,6	8,97
13,2	12,7	3,94	43,4	45,3	4,19	50,3	49,5	1,62	78,0	86,6	9,93	103,0	107,3	4,01
17,8	18,8	5,32	43,5	43,4	0,23	50,6	49,4	2,43	78,1	83,7	6,69	103,7	111,2	6,74
21,1	20,8	1,44	43,8	46,1	4,99	50,7	55,7	8,98	78,7	81,7	3,67	104,4	106,9	2,34
21,8	21,8	0,00	44,0	43,8	0,46	51,2	51,2	0,00	79,4	81,9	3,05	104,7	108,2	3,23
23,2	21,5	7,91	44,0	45,2	2,65	51,3	54,2	5,35	79,5	87,5	9,14	105,0	114,7	8,46
23,6	24,5	3,67	44,0	47,9	8,14	51,3	56,7	9,52	80,4	84,4	4,74	105,8	104,0	1,73
23,8	24,0	0,83	44,4	45,7	2,84	51,9	57,6	9,90	81,1	89,9	9,79	105,8	105,0	0,76
25,5	26,7	4,49	44,5	47,7	6,71	52,0	56,3	7,64	82,4	86,1	4,30	106,1	109,0	2,66
29,1	28,2	3,19	44,6	45,5	1,98	52,2	57,4	9,06	83,4	88,8	6,08	106,6	104,8	1,72
30,5	33,4	8,68	44,6	43,8	1,83	52,4	53,3	1,69	85,5	86,3	0,93	107,3	104,6	2,58
32,2	33,4	3,59	44,9	43,8	2,51	52,7	49,6	6,25	85,7	84,0	2,02	108,0	112,5	4,00
32,7	33,4	2,10	44,9	43,8	2,51	52,8	52,2	1,15	85,9	93,0	7,63	108,6	107,7	0,84
32,7	35,0	6,57	44,9	45,7	1,75	53,5	54,7	2,19	86,5	92,2	6,18	108,6	101,8	6,68
32,9	35,6	7,58	45,2	47,4	4,64	53,6	58,6	8,53	86,6	91,7	5,56	108,8	105,2	3,42
33,1	35,1	5,70	45,2	44,1	2,49	53,8	54,2	0,74	86,7	93,9	7,67	108,9	120,9	9,93
33,6	34,0	1,18	45,5	49,1	7,33	53,8	50,0	7,60	86,9	89,8	3,23	109,0	104,8	4,01
34,7	35,6	2,53	45,7	46,0	0,65	53,9	56,9	5,27	88,4	80,6	9,68	109,1	110,6	1,36
34,9	36,9	5,42	45,8	50,1	8,58	54,3	57,9	6,22	90,0	92,3	2,49	109,2	106,6	2,44
35,4	36,4	2,75	46,0	49,2	6,50	54,9	53,8	2,04	90,1	96,5	6,63	109,3	115,1	5,04
35,4	36,7	3,54	46,0	45,9	0,22	55,0	56,2	2,14	90,3	97,9	7,76	109,5	112,2	2,41
35,5	37,1	4,31	46,1	46,8	1,50	55,3	56,7	2,47	90,9	96,6	5,90	109,9	109,8	0,09
35,9	36,1	0,55	46,1	45,6	1,10	55,7	60,3	7,63	91,6	88,5	3,50	110,3	110,7	0,36
37,4	37,2	0,54	46,1	44,5	3,60	56,0	57,1	1,93	91,9	102,1	9,99	111,2	102,8	8,17
37,8	41,9	9,79	46,1	45,8	0,66	56,5	52,8	7,01	92,4	100,7	8,24	111,4	122,7	9,21
38,0	41,5	8,43	46,3	45,8	1,09	56,6	57,3	1,22	93,9	97,0	3,20	111,8	116,7	4,20
38,1	38,7	1,55	46,3	47,4	2,32	58,0	54,4	6,62	94,1	94,8	0,74	111,8	114,5	2,36
38,1	42,3	9,93	46,4	46,1	0,65	58,1	59,0	1,53	94,1	100,3	6,18	112,2	112,8	0,53
38,2	42,2	9,48	46,9	48,1	2,49	59,6	57,2	4,20	95,1	101,2	6,03	112,2	114,1	1,67
38,2	39,9	4,26	47,0	49,8	5,62	60,0	59,9	0,17	95,1	103,4	8,03	113,2	116,8	3,08

38,4	40,4	4,95	47,2	47,5	0,63	60,6	61,1	0,82	95,2	103,9	8,37	113,3	110,9	2,16
38,9	38,8	0,26	47,3	48,7	2,87	60,8	59,2	2,70	95,7	105,5	9,29	113,4	105,7	7,28
39,1	39,7	1,51	47,6	46,1	3,25	60,8	55,6	9,35	96,1	93,9	2,34	114,1	121,7	6,24
39,2	41,7	6,00	47,7	49,6	3,83	61,2	67,6	9,47	96,7	101,2	4,45	114,2	111,3	2,61
39,2	38,9	0,77	47,7	44,8	6,47	61,3	62,8	2,39	96,7	97,7	1,02	114,3	105,7	8,14
39,2	41,8	6,22	47,7	47,5	0,42	61,6	63,3	2,69	96,8	94,1	2,87	115,3	113,1	1,95
39,6	43,6	9,17	47,9	48,5	1,24	63,5	69,6	8,76	96,8	100,9	4,06	115,9	109,5	5,84
39,7	40,4	1,73	48,0	48,7	1,44	64,0	69,8	8,31	97,7	107,5	9,12	116,7	115,2	1,30
40,0	40,6	1,48	48,0	49,3	2,64	64,6	64,6	0,00	97,9	106,1	7,73	117,0	112,9	3,63
40,1	39,8	0,75	48,2	48,5	0,62	64,9	67,7	4,14	97,9	100,8	2,88	117,5	114,5	2,62
40,3	37,2	8,33	48,3	48,9	1,23	65,0	60,9	6,73	98,5	102,3	3,71	118,0	118,5	0,42
40,5	41,6	2,64	48,3	47,7	1,26	65,8	66,9	1,64	98,5	104,0	5,29	118,2	123,0	3,90
41,3	45,1	8,43	48,6	50,8	4,33	68,6	65,1	5,38	98,8	95,5	3,46	120,2	126,0	4,60
41,5	43,3	4,16	48,7	50,4	3,37	69,5	76,1	8,67	99,5	96,7	2,90	121,9	132,0	7,65
41,6	40,8	1,96	48,9	53,1	7,91	71,0	71,3	0,42	99,8	104,8	4,77	123,1	122,7	0,33
41,7	43,5	4,14	49,0	45,8	6,99	72,0	70,8	1,69	99,9	103,3	3,29	123,2	124,4	0,96
42,1	44,4	5,18	49,2	50,5	2,57	72,4	69,0	4,93	100,2	105,4	4,93	143,3	141,2	1,49
42,3	45,1	6,21	49,2	52,9	6,99	75,1	77,7	3,35	101,0	103,0	1,94	149,8	151,5	1,12

A análise de 250 amostras originou valores de erro relativo inferiores a 10%, mesmo no caso de amostras de pão com baixos teores em sal. A correlação entre os valores sugere também a concordância entre os resultados dos dois métodos. Os coeficientes de correlação múltipla (R), o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de determinação ajustado foram iguais a, respectivamente, 0,993, 0,987 e 0,987. O erro padrão da estimativa foi igual a 3,48.

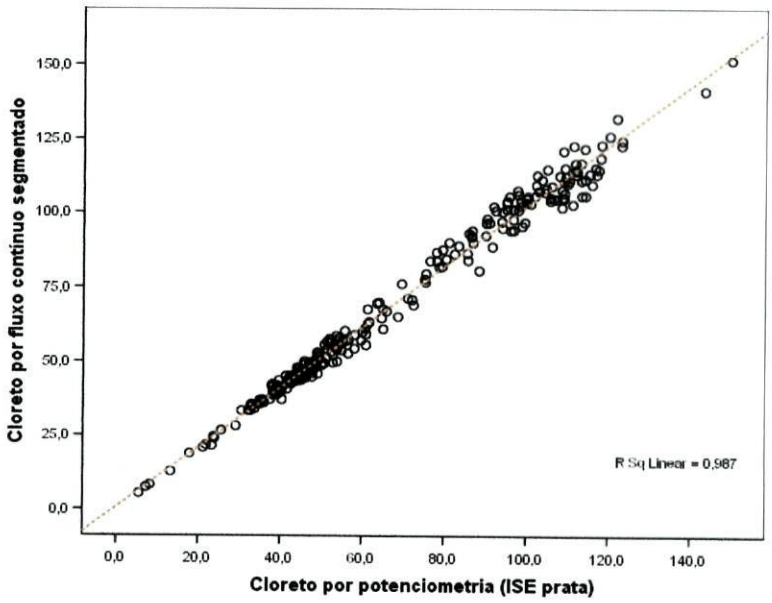


Figura IV-16 Regressão entre os dois métodos utilizados na análise de pão (linha a tracejado corresponde à linha de tendência dos valores previstos).

Os dados obtidos apresentam-se segundo uma distribuição normal, quer quando considerados na globalidade, quer quando separados de acordo com o tipo de pão analisado, mas não apresentam igualdade de variâncias. Este comportamento impede uma avaliação estatística mais profunda dos resultados e advém da elevada diversidade de níveis de concentração associados a cada tipo de pão (Tabela IV-11 e IV-12 e Figuras IV-17 e IV-18). Numa perspectiva puramente estatística os amostras de menor concentração, na ordem dos 5 mg/L, parecem indicar erros menores do que as amostras com as concentrações mais elevadas, na ordem 100 mg/L, uma vez que os cálculos associados consideram desvios absolutos. O erro relativo sugere o contrário, já que os erros menores se verificam nas concentrações superiores.

Tabela IV-11 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos presente nos diferentes tipos de Pão (Portaria 425/98), obtidos para FIA e FCS, adquiridos em Hipermercados e padarias locais da região Norte.

Tipo de Pão	Valor máximo		Valor mínimo		Média		Desvio Padrão	
	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS
Pão de trigo	116,7	121,7	85,9	89,8	104,4	106,5	9,1	7,8
Pão integral	118,2	123,0	38,0	41,5	93,9	97,2	23,0	22,4
Pão de centeio	120,2	126,0	85,7	84,0	100,5	104,0	11,2	10,6
Pão de mistura	115,9	120,9	86,6	88,5	100,1	102,3	8,6	8,0
Broa de Milho	149,8	151,5	58,1	59,0	91,5	94,0	26,9	25,8
Pão Especial sem sal	8,2	8,2	7,2	7,4	7,7	7,8	0,7	0,5
Pão Especial meio sal	88,4	80,6	23,2	21,5	54,7	53,5	21,3	19,0
Pão Especial de leite	143,3	141,2	52,2	57,4	95,3	96,8	26,0	23,6
Pão de água	123,2	132,0	69,5	76,1	93,6	98,2	17,7	17,9

Tabela IV-12 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos presente nos diferentes tipos de Pão (Portaria 425/98), obtidos para FIA e FCS, adquiridos em Hipermercados e padarias locais da região de Coimbra.

Tipo de Pão	Valor máximo		Valor mínimo		Média		Desvio Padrão	
	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS
Pão de trigo	63,3	61,6	43,3	41,5	50,2	49,2	5,0	4,8
Pão integral	70,8	72,0	5,3	5,5	37,4	37,2	20,4	20,9
Pão de centeio	57,9	54,3	36,7	35,4	46,3	45,0	7,3	6,4
Pão de mistura	62,8	61,3	20,8	21,1	44,1	42,4	10,6	10,0
Pão meio sal	-	-	-	-	-	-	-	-
Pão-de-leite	-	-	-	-	-	-	-	-
Pão de água	64,6	64,6	34,0	32,7	45,5	44,3	8,9	9,7
Pão de sementes	46,0	45,7	24,0	23,8	37,9	38,1	12,1	12,4
Pão Pardo	50,8	48,6	36,1	35,4	41,1	40,0	8,4	7,5
Pão de soja	38,8	38,9	33,4	32,2	36,1	35,6	3,8	4,7

Pão parolo	60,9	65,0	40,6	40,0	51,6	51,8	6,8	7,6
Pão da Mealhada	49,6	52,7	37,2	40,3	44,2	46,9	4,5	4,7
Pão de azeite	-	-	-	-	-	-	-	-
Pão de aveia	-	-	-	-	-	-	-	-
Pão de cereais	44,4	42,5	41,9	37,8	42,9	40,8	1,3	2,6
Pão de Viana	-	-	-	-	-	-	-	-
Pão de fibras	-	-	-	-	-	-	-	-
Pão de passas	-	-	-	-	-	-	-	-

A grande diversidade de concentrações de cloreto existente nas amostras pode ser facilmente identificada através das caixas de bigodes representadas nas Figuras IV-17 e IV-18. A caixa de bigodes é um rectângulo que assinala os quartis da distribuição. Nos extremos de cada bigode posicionam-se as observações mínima e máxima.

Em ambas as caixas de bigodes é possível constatar a existência de outliers. Os da região Norte são apenas moderados (assinalados com bolinha) e os da região de Coimbra podem ser severos (assinalado com asterisco). Verifica-se ainda uma elevada dispersão de valores. Entre as amostras estudadas, o pão integral, a Broa de Milho e o pão-de-leite são os que apresentam uma variabilidade mais elevada originando coeficientes de variação iguais a 34,2%, 78,9% e 32,0%, respectivamente. Os pães sem sal constituem um grupo mais semelhante, mas se o conjunto de pães sem sal fosse analisado de forma isolada seria fácil constatar que a dispersão de teores de cloreto é também elevada.

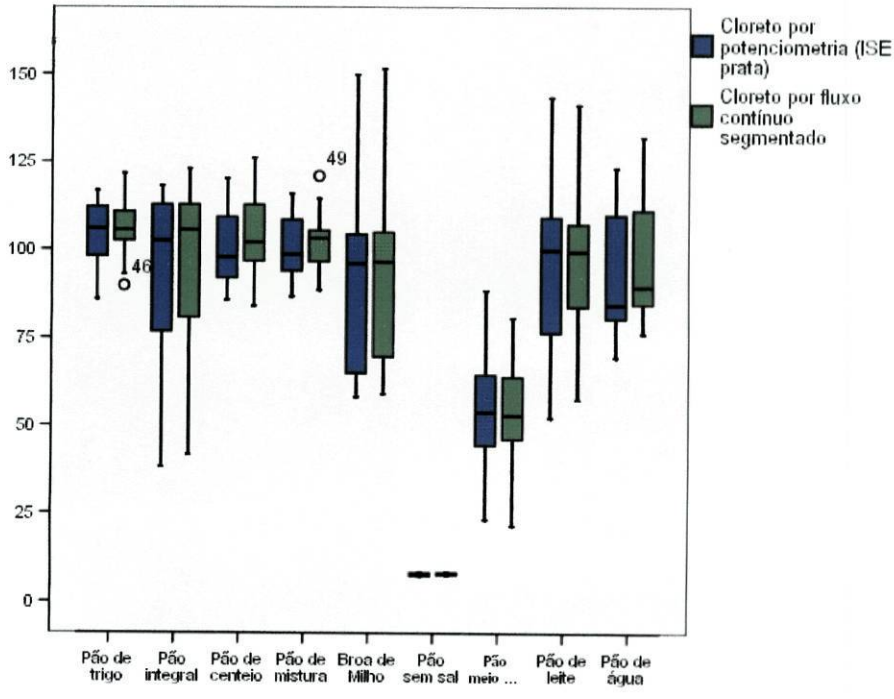


Figura IV-17 Diagrama de caixa e bigodes para as amostras de pão da região Norte (valores de mg/L em Y)

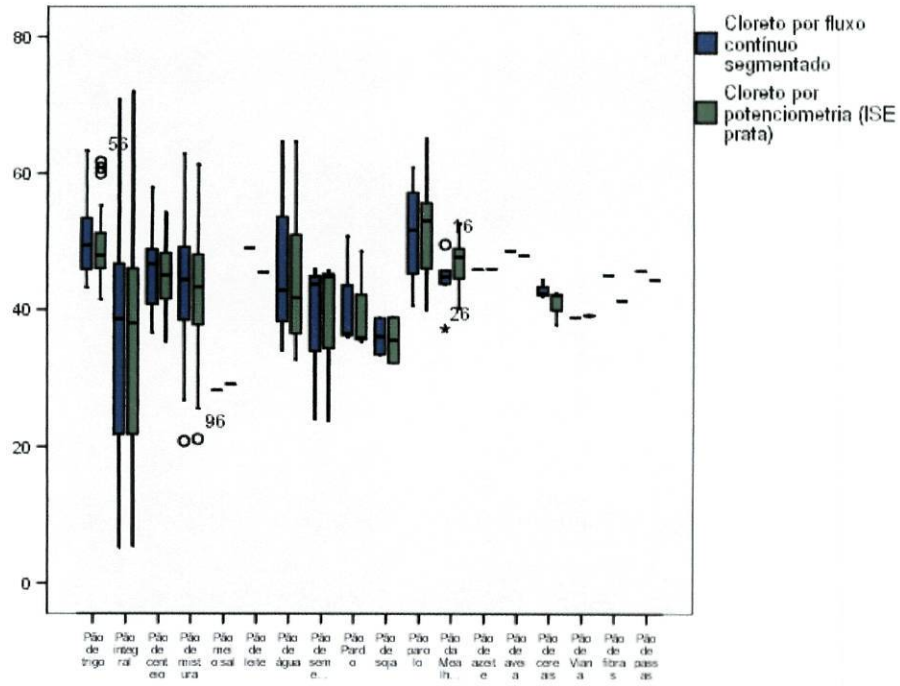


Figura IV-18 Diagrama de caixa e bigodes para as amostras de pão da região de Coimbra (valores de mg/L em Y).

IV.7.2. Relação do teor de sal com o teor de cloretos.

As amostras de pão da região norte foram também estudadas relativamente aos seus teores em sódio. Em caso de igualdade estatística entre os teores destes dois iões, a proveniência de ambos no pão seria justificada pela adição intencional de sal aquando da sua preparação. No caso de um dos iões ter um valor sistematicamente mais elevado, poder-se-ia considerar que algum constituinte comum do pão seria o responsável por este registo.

A comparação dos teores de sódio e de cloreto foi efectuada relativamente ao método potenciométrico, para as amostras da região Norte (Tabela IV-13) e da região de Coimbra (Tabela IV 14). Os resultados de desvio relativo entre eles indicam uma variação aleatória dos níveis de cloreto relativamente ao nível de sódio. Esta diferença foi confirmada por comparação de amostras emparelhadas através do teste *t de* Student. Os valores de *t* obtidos foram 21,8 e 20,7 para, respectivamente, os métodos de potenciometria e de FCS, podendo-se afirmar, com 95 % de confiança, que os níveis de cloreto e de sódio nos pães analisados são diferentes.

Tabela IV-13 Teores de sódio nas amostras da região Norte obtidos com ESI de sódio e deduzidos a partir do método potenciométrico (em valor equivalente, Ceq) e os desvios relativos (DR) correspondentes.

Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)	Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)	Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)	Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)	Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)
75,7	74,4	1,7	63,4	77,8	-22,7	70,5	116,1	-64,8	51,5	56,7	-10,1	57,5	64,6	-12,3
76,2	55,6	27,1	61,8	57,7	6,6	79,9	65,3	18,2	72,5	77,5	-6,8	72,3	96,2	-33,1
69,2	57,6	16,7	63,5	51,6	18,8	4,7	4,4	5,8	67,7	53,0	21,8	53,0	86,8	-63,8
61,1	45,3	25,8	64,8	67,8	-4,6	70,7	153,8	-117,5	4,7	4,3	7,9	52,3	66,1	-26,4
5,3	4,6	13,5	70,8	65,3	7,7	72,1	47,8	33,7	25,4	26,8	-5,4	59,0	72,7	-23,3
63,9	46,8	26,8	50,7	53,9	-6,4	74,2	55,1	25,7	46,1	39,3	14,7	66,5	92,1	-38,5
39,8	32,7	17,8	63,5	64,1	-0,9	64,6	52,4	18,8	73,6	79,9	-8,6	68,1	105,9	-55,5
70,9	66,8	5,8	63,9	55,5	13,2	75,2	60,4	19,7	74,1	74,5	-0,5	30,9	43,2	-39,6
62,7	57,4	8,5	39,7	40,6	-2,2	62,3	54,5	12,6	51,1	42,4	17,0	53,2	68,6	-28,9
70,1	87,3	-24,6	4,3	4,6	-7,4	5,0	4,3	13,9	64,1	67,1	-4,7	44,1	60,2	-36,7
59,6	56,1	5,9	43,9	45,2	-2,9	70,8	64,8	8,5	42,1	44,1	-4,7	45,4	68,6	-51,0
68,0	75,8	-11,5	68,6	57,8	15,8	79,9	88,9	-11,2	36,7	28,6	22,0	57,4	79,3	-38,3
65,5	116,2	-77,3	42,7	46,5	-8,9	62,8	54,5	13,2	71,0	22,7	68,0	47,4	59,4	-25,2
38,2	51,9	-35,8	75,9	65,9	13,2	52,4	51,0	2,7	93,0	88,9	4,4	74,8	77,4	-3,5
34,8	26,7	23,2	55,5	47,8	13,8	49,9	47,7	4,4	50,3	39,3	21,9	72,8	74,2	-1,9
73,4	85,4	-16,3	70,6	61,7	12,6	65,0	73,2	-12,6	41,5	45,9	-10,5	71,3	62,5	12,3
48,7	52,7	-8,2	47,0	42,1	10,4	59,0	47,7	19,1	56,3	62,2	-10,6	67,9	70,7	-4,1
67,3	82,4	-22,5	56,4	51,6	8,5	54,6	53,1	2,8	45,1	49,5	-9,8	64,8	80,8	-24,8
46,8	66,1	-41,3	48,9	46,5	4,8	53,5	45,9	14,2	66,8	53,1	20,5	51,6	44,2	14,3
33,9	76,9	-127,1	52,6	47,6	9,5	53,0	55,8	-5,3	66,2	59,9	9,6	24,7	34,2	-38,7
60,0	57,1	4,9	70,7	62,6	11,4	66,4	58,9	11,3	76,6	78,5	-2,5	63,8	56,8	11,0
75,7	74,4	1,7	50,9	49,8	2,1	76,7	70,9	7,5	52,2	41,9	19,7	54,1	64,5	-19,2
76,2	55,6	27,1	55,2	59,4	-7,6	64,6	68,4	-6,0	56,2	48,3	14,0	61,7	62,9	-1,9
69,2	57,6	16,7	59,6	66,1	-11,0	72,5	61,0	15,9	62,7	53,1	15,4	55,7	66,3	-19,0
61,1	45,3	25,8	64,2	82,0	-27,7	69,6	64,3	7,6	73,5	78,4	-6,7	50,6	61,1	-20,7
5,3	4,6	13,5	49,8	41,9	15,9	68,6	66,5	3,1	68,8	70,7	-2,7	56,1	55,6	0,9
63,9	46,8	26,8	60,1	54,0	10,2	31,9	29,7	7,0	61,7	68,6	-11,2	53,5	58,3	-9,1
39,8	32,7	17,8	64,8	40,0	38,3	71,6	72,1	-0,8	62,1	86,8	-39,8	60,9	158,0	-159,3
70,9	66,8	5,8	70,5	53,8	23,6	15,1	14,2	5,7	97,2	86,8	10,7	58,5	70,3	-20,3
62,7	57,4	8,5	55,6	105,8	-90,3	58,4	55,0	5,8	33,7	46,7	-38,7	50,2	44,1	12,2
66,2	80,9	-22,2	72,8	84,8	-16,5	74,0	50,6	31,6	31,0	29,6	4,6	59,9	53,1	11,4

Tabela IV-14 Teores de sódio nas amostras da região do Coimbra obtidos com ESI de sódio e deduzidos a partir do método potenciométrico (em valor equivalente, Ceq) e os desvios relativos correspondentes.

Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)	Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)	Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)	Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)	Ceq (mg/L)	ESI (mg/L)	ER (%)
26,9	27,4	1,8	33,7	37,3	10,8	36,7	38,9	5,9	27,6	28,6	3,7	36,3	43,0	18,4
35,2	28,5	-19,1	18,9	19,5	3,3	35,9	50,5	40,8	24,9	43,6	75,0	42,2	30,0	-28,9
29,8	25,0	-16,2	21,8	22,3	2,3	44,5	39,9	-10,4	26,3	23,8	-9,4	39,3	43,0	9,4
26,0	26,2	0,7	31,6	28,8	-8,9	40,0	41,8	4,6	29,3	22,1	-24,6	32,1	34,3	7,0
29,1	27,3	-6,3	32,8	35,4	7,8	28,4	29,8	4,9	31,1	26,6	-14,6	41,9	38,1	-9,1
14,1	16,1	13,8	24,8	26,1	5,3	32,0	31,2	-2,5	28,2	32,8	16,5	28,8	30,0	4,1
30,0	28,6	-4,8	29,9	32,8	9,7	39,4	34,7	-12,0	28,5	24,9	-12,8	34,9	33,3	-4,6
24,3	26,2	8,0	30,6	36,4	18,9	34,9	32,7	-6,3	31,3	20,1	-35,9	24,7	26,7	8,0
22,5	19,2	-14,7	29,5	30,1	2,0	23,0	26,1	13,3	27,3	21,9	-19,8	29,3	28,8	-1,8
23,0	22,6	-1,6%	24,8	32,6	31,5	35,0	34,1	-2,5	21,3	25,4	19,0	28,5	29,9	4,7
35,7	32,9	-7,8	28,2	43,6	54,5	34,3	31,4	-8,3	18,6	17,6	-5,2	26,0	31,4	21,0
31,7	28,8	-9,2	30,4	31,4	3,2	33,3	27,2	-18,3	63,1	86,3	36,8	35,6	32,3	-9,3
25,2	27,3	8,2	25,8	29,8	15,7	31,3	23,0	-26,6	30,5	49,8	63,3	27,0	26,3	-2,6
2,7	3,1	16,5	30,9	33,1	7,2	29,1	26,1	-10,4	31,9	26,1	-18,2	28,2	21,3	-24,4
31,3	27,2	-13,0	29,8	29,7	-0,5	25,4	19,9	-21,6	29,9	31,5	5,3	30,9	22,0	-28,9
34,2	29,9	-12,6	31,8	32,9	3,5	38,7	41,1	6,3	21,2	21,9	3,2	29,1	21,8	-25,2
30,9	37,6	21,5	21,2	22,3	5,1	31,1	31,4	0,8	13,7	25,1	83,3	27,8	29,2	5,2
39,8	44,6	12,1	33,2	31,3	-5,8	8,6	8,5	-0,7	11,5	12,7	10,0	31,5	31,8	0,9
46,7	32,7	-30,0	32,4	35,2	8,5	24,6	21,0	-14,6	25,4	9,2	-63,8	15,3	15,9	3,8
33,7	37,4	10,9	28,5	31,6	10,7	23,0	25,0	8,8	15,4	20,3	31,5	27,6	25,7	-6,8
39,4	45,8	16,1	28,9	32,9	13,7	20,9	25,0	19,7	32,6	15,2	-53,4	23,3	22,8	-2,1
31,1	3,1	-90,0	30,0	32,4	7,9	28,9	23,8	-17,8	29,9	26,1	-12,7	30,6	33,8	10,4
3,6	3,1	-13,1	27,4	29,7	8,2	24,5	23,9	-2,5	22,6	21,8	-3,7	31,5	35,2	11,6
29,1	26,2	-10,1	30,7	28,6	-6,8	21,2	19,2	-9,5	32,1	16,7	-48,0	38,9	33,0	-15,2
33,3	30,1	-9,6	27,1	26,5	-2,1	29,2	23,9	-18,1	19,8	28,7	45,0	37,6	36,8	-2,2
26,1	24,0	-8,2	34,0	33,9	-0,3	21,5	18,9	-12,0	26,8	20,9	-22,0	36,1	29,2	-19,2
34,7	22,0	-36,6	32,9	37,9	15,2	29,7	28,3	-4,8	16,5	12,2	-26,3	29,7	22,7	-23,4
30,9	31,2	0,8	19,8	21,6	9,2	28,5	31,9	11,7	30,1	22,7	-24,6			
25,4	30,5	19,9	32,1	33,3	3,7	23,3	25,7	10,3	29,9	23,7	-20,8			
25,7	25,7	0,0	24,7	21,7	-12,2	25,2	25,9	2,9	28,9	27,1	-6,1			

As diferenças entre os valores de sódio e o valor equivalente em sódio esperado pela adição de NaCl ao pão foram representados graficamente nas Figuras IV-19 e IV-20. Os valores indicados não seguem uma tendência constante, apresentando tanto desvios negativos como positivos. Assim, no caso em que os teores de sódio no pão foram superiores aos valores de sódio esperado (por dedução a partir do teor em cloreto) significa que houve uma fonte adicional de sódio, para além da própria adição de NaCl. No caso contrário houve um fonte adicional de cloreto. Estas fontes devem ter origem nos diversos ingredientes utilizados aquando da preparação do pão.

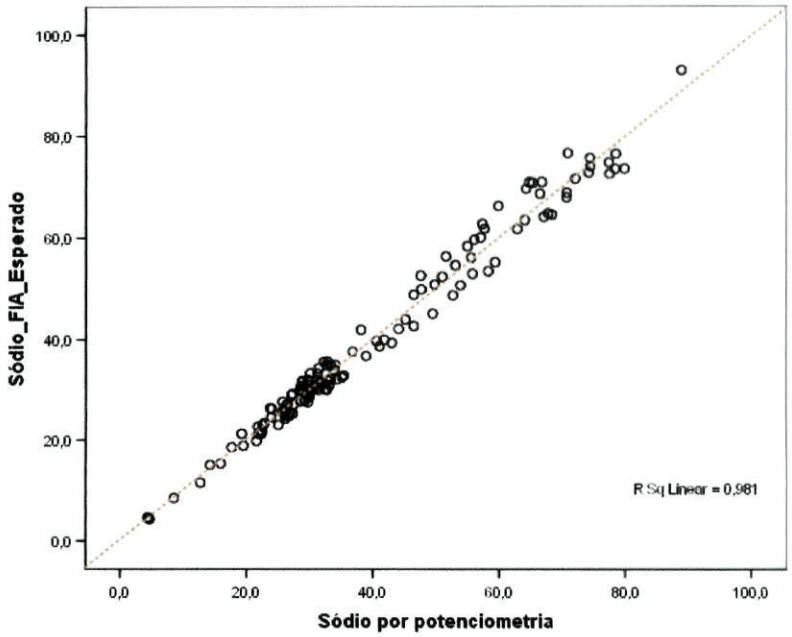


Figura IV-19 Representação dos valores de sódio e o valor equivalente em sódio esperado pela adição de NaCl ao pão, por FIA.

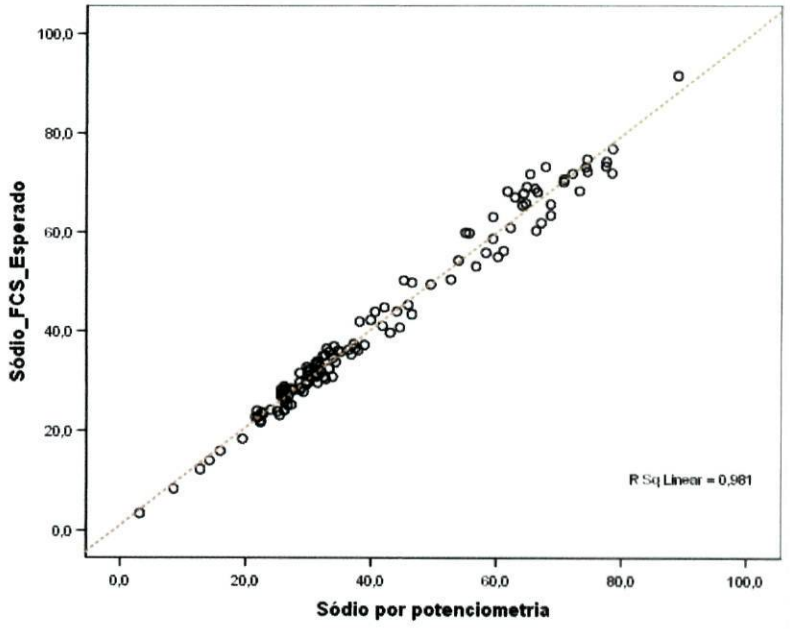


Figura IV-20 Representação dos valores de sódio e o valor equivalente em sódio esperado pela adição de NaCl ao pão, por FIA.

Os teores de cloretos são muito diferentes no vários tipos de pão. A análise das caixas de bigodes anteriores indica que o pão sem sal apresenta valores muito diferentes dos restantes. O mesmo não se pode dizer relativamente ao pão meio-sal, com valores muito dispersos, dependendo do local de aquisição do pão.

O estudo do efeito do tipo de pão no teor de cloretos observado para as diversas amostras pode ser efectuado através da Análise de Variância (ANOVA). Neste sentido torna-se necessário garantir a normalidade e a igualdade de variância nos resultados obtidos para cada tipo de pão. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* é um dos testes usados para decidir se a distribuição da variável em estudo provém de uma população com uma distribuição específica. Quando o número de observações é inferior a 50, o teste aplicável é o de *Shapiro-Walk*. Os valores de ambos os testes encontram-se indicados nas tabelas IV-15 e IV-16. Com a excepção do pão integral da região Norte, todos os valores de *p* obtidos foram superiores a 0,05. Com uma probabilidade de erro de 5% e exceptuando o pão de água, conclui-se que a distribuição os teores de cloreto para os vários tipos de pão obtidos pelos dois métodos é normal.

Tabela IV-15 Valores de *p-value* do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk (região Norte).

Tipo de Pão	Kolmogorov-Smirnov [a]		Shapiro-Wilk	
	p-value		*p-value*	
	FIA	FCS	FIA	FCS
Pão de trigo	0,143	0,200*	0,123	0,886
Pão integral	0,121	0,051	0,031	0,043
Pão de centeio	0,200*	0,200*	0,299	0,936
Pão de mistura	0,200*	0,200*	0,421	0,845
Broa de Milho	0,200*	0,200*	0,321	0,404
Pão sem sal	-	-	-	-
Pão meio sal	0,200*	0,200*	0,979	0,976
Pão-de-leite	0,200*	0,200*	0,865	0,953
Pão de água	0,018	0,019	0,076	0,098

*This is a lower bound of the true significance
[a] Lilliefors Significance Correction

Tabela IV-16 Valores de *p-value* do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk (região de Coimbra).

Tipo de Pão	Kolmogorov-Smirnov [a]		Shapiro-Wilk	
	p-value		*p-value*	
	FIA	FCS	FIA	FCS
Pão de trigo	0,096	0,200*	0,059	0,067
Pão integral	0,200*	0,200*	0,707	0,809
Pão de centeio	0,200*	0,200*	0,998	0,882
Pão de mistura	0,200*	0,200*	0,976	0,862
Pão de água	0,200*	0,169	0,073	0,091
Pão de sementes	-	-	0,062	0,174
Pão Pardo	-	-	0,064	0,034
Pão de soja	-	-	-	-
Pão parolo	0,200*	0,200*	0,970	0,777
Pão da Mealhada	0,200*	0,200*	0,975	0,645
Pão de cereais	-	-	0,147	0,363

* This is a lower bound of the true significance.

As avaliações ANOVA posteriores foram baseadas no teste Tukey e indicam diferenças significativas entre os tipos de pão. Mediante as diferenças encontradas, os tipos de pão foram aglutinadas em três grupos diferentes. Com um nível de significância de 0,05, e ultrapassando o princípio da homogeneidade, pode concluir-se que o pão sem sal e o pão meio sal são significativamente diferentes entre si e dos restantes tipos de pão, i.e., os níveis de cloreto nas amostras de pão da região Norte sem sal são diferentes dos níveis de cloreto no pão de amostras meio-sal e, por sua vez, estes dois grupos são diferentes dos restantes tipos de pão (Tabela IV 17).

Tabela IV-17 *Subsets* de ANOVA para α= 0,05 e amostras da região do Norte.

Tipo de Pão	FIA			FCS		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Pão sem sal	7,7	-	-	7,8	-	-
Pão meio sal	-	54,7	-	-	53,5	-
Broa de Milho	-	-	91,5	-	-	94,0
Pão de água	-	-	93,6	-	-	96,8
Pão integral	-	-	93,9	-	-	97,2
Pão-de-leite	-	-	95,3	-	-	98,2
Pão de mistura	-	-	100,1	-	-	102,4

Pão de centeio			100,5			104,0
Pão de trigo			104,4			106,5
Valor de *p*	1,00	1,00	0,88	1,00	1,00	0,87

IV.7.4. Variação do teor de cloreto no pão segundo os locais de venda

Todos os pães analisados foram adquiridos em hipermercados e algumas padarias de venda ao público. Agrupando todos os resultados mediante este factor, encontram-se valores médios entre 86 e 101 mg/L (Tabela IV-18). A variabilidade dentro de cada hipermercado/padaria é elevada, já que mais de 50 % dos locais apresentam desvios superiores a 20 %.

Tabela IV-18 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos presente nos diferentes Hipermercados da região Norte, obtidos por FIA e FCS.

Hipermercados	Média		Desvio Padrão		Mínimo		Máximo	
	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS
Carrefour	83,3	86,0	32,4	33,8	7,2	7,4	118,2	123,0
Eleclerc	83,0	84,2	22,0	20,7	38,0	41,5	117,0	112,9
Feira-Nova	101,4	102,4	13,2	13,0	79,5	80,6	115,3	113,1
Intermarché	92,9	98,7	12,5	12,0	78,0	86,1	114,1	121,7
Jumbo	99,9	104,5	20,7	19,5	53,6	58,6	149,8	151,5
Modelo/Continente	91,8	93,7	31,5	31,7	8,2	8,2	121,9	132,0
Pingo-Doce	93,7	94,6	19,2	19,0	56,5	52,8	118,0	118,5
Froiz	99,6	109,0	4,0	4,5	95,2	103,9	105,0	114,7
Padaria local	100,1	101,6	20,8	19,1	52,2	57,4	143,3	141,2

Para avaliar a igualdade ou desigualdade estatística entre os teores de cloretos nos vários locais de venda de pão incluídos neste estudo recorreu-se novamente ao teste Tukey. Quando o conjunto de amostras é avaliado segundo o "fornecedor" (qual o hipermercado ou as padarias locais), os resultados apresentam-se segundo uma distribuição normal (Tabela IV-19) e com igualdade de variâncias. Apenas um dos hipermercados não seguiu este comportamento, tal como se pode verificar na Tabela IV-19. Segundo a *Levene statistic* os valores de *p* para os métodos potenciométrico e FCS são, respectivamente, 0,194 e 0,226. O valor de *p* para a variância intra e inter-grupos ANOVA origina também valores maiores de 0,05, iguais a respectivamente 0,231 e 0,074.

Tabela IV-19 Valores de *p-value* do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk (região Norte).

Local de Venda	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilks	
	p-value		*p-value*	
	FIA	FCS	FIA	FCS
Eleclerc	0,200	0,200	0,981	0,724
Intermarché	0,130	0,200	0,128	0,164
Pingo-Doce	0,200	0,200	0,415	0,385
Carrefour	0,058	0,098	0,011	0,019
Modelo/Continente	0,041	0,155	0,012	0,017
Froiz	0,200	0,200	0,574	0,627
Padaria local	0,073	0,200	0,172	0,491
Feira-Nova	0,200	0,083	0,448	0,049
Jumbo	0,022	0,009	0,020	0,004

Os resultados do teste tukey indicaram apenas um grupo de amostras para o factor hipermercado. Pode afirmar-se, para um nível de significância de 0,05, que os teores de cloreto nos pães são iguais nos diversos locais de venda ao público de pão indicados neste estudo. Os resultados da região de Coimbra não foram incluídos neste estudo já que as amostras dessa região provinham todas de padarias locais.

IV.7.5. Variação do teor de sal em algumas cidades

Os pães analisados neste trabalho foram comprados em várias cidades diferentes, e em quatro regiões de uma dessas cidades. Os valores mínimos, máximos e os desvios estão indicados na Tabela IV-20. Os valores médios oscilam entre 84 e 112 mg/L para o método proposto nas amostras da região Norte. Os valores mais baixos foram obtidos na cidade de Gaia e os mais elevados na cidade de Gondomar. A amplitude de variação dos valores médios não é, porém, muito elevada. A maior dispersão de valores dentro de cada cidade foi encontrada em Porto-Antas.

Tabela IV-20 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos presente nas diferentes cidades da região Norte, obtidos quer para FIA, quer para FCS.

Cidades	Média		Desvio Padrão		Mínimo		Máximo	
	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS
Alfena	89,9	95,1	11,1	9,4	78,0	86,1	112,2	114,1
Braga	99,1	101,5	25,0	26,0	49,2	50,5	118,2	123,0
Gaia	83,8	87,4	32,5	34,5	7,2	7,4	121,9	132,0
Paços de Ferreira	88,0	94,3	14,7	18,8	75,3	76,7	108,9	120,9
Valongo	88,8	87,2	21,7	20,2	58,1	59,0	117,0	112,9
Sta Maria da Feira	90,0	93,9	22,6	21,2	38,0	41,5	115,3	113,1
Matosinhos	92,9	96,5	16,6	14,9	61,2	67,6	118,0	118,5
Vila Nova da Telha	103,3	111,2	15,3	14,8	92,4	100,7	114,1	121,7
Porto - Sé	97,9	98,7	21,1	19,9	52,2	57,4	123,1	122,7
Porto - Cedofeita	109,9	105,7	9,4	9,9	96,1	93,9	123,2	124,4
Porto - Paranhos	96,9	105,9	1,5	1,8	95,2	103,9	97,9	107,5
Maia	92,5	95,4	22,7	21,6	56,5	52,8	143,3	141,2
Gondomar	111,9	116,8	20,1	18,5	95,1	101,2	149,8	151,5
Rio Tinto	88,4	80,6	-	-	88,4	80,6	88,4	80,6
Porto - Baixa	103,9	108,7	7,7	9,1	98,5	102,3	109,3	115,1
Porto - Antas	88,6	87,5	45,9	45,1	8,2	8,2	117,5	115,2

Na região de Coimbra os teores de cloreto são genericamente inferiores aos obtidos na região Norte, não ultrapassando os 60 mg/L (Tabela IV-21). A dispersão de valores dentro das várias freguesias de Coimbra é, em valor absoluto, mais moderada.

Tabela IV-21 Valores máximos e mínimos, média e desvio padrão do teor de cloretos presente nas diferentes Freguesias da região de Coimbra, obtidos por FIA e FCS.

Freguesias	Média		Desvio Padrão		Mínimo		Máximo	
	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS	FIA	FCS
Olivais	47,3	50,1	6,5	7,3	41,5	43,3	54,3	57,9
Zizânia	37,2	37,2	8,1	7,8	21,8	21,8	46,3	45,8
Diodoro	48,6	49,3	5,5	5,9	38,9	38,8	55,0	56,2
Flor do Mondego	61,5	62,3	8,2	6,3	52,0	56,3	72,0	70,8
Arco-íris	38,0	37,8	18,6	19,2	5,5	5,3	51,3	54,2
Pingo Doce	42,0	43,6	9,7	11,0	29,1	28,2	51,9	57,6
Tosta Rica	43,3	44,6	3,6	4,0	38,2	39,9	46,9	49,1
Vasco da Gama	45,8	45,0	6,3	5,6	32,7	33,4	51,2	51,2
Palmeira	44,4	46,0	2,4	2,0	41,7	43,5	47,3	48,7

Mimosa	58,2	58,1	7,1	5,0	52,4	53,3	68,6	65,1
Quimbres	52,7	54,7	12,6	12,2	43,8	46,1	61,6	63,3
Império	49,9	49,6	10,7	8,5	35,5	37,1	60,8	55,6
Dianteiro	53,4	54,6	0,8	3,3	52,8	52,2	53,9	56,9
Camões	49,6	50,6	8,5	8,2	39,1	39,7	59,6	57,2
Vénus	35,2	36,2	12,3	12,7	13,2	12,7	48,0	48,7
D. Broa	37,8	39,3	6,6	5,9	33,1	35,1	42,5	43,5
Marisol	43,0	44,7	4,4	4,3	38,4	40,4	48,0	49,3
Pérola	42,1	43,6	5,7	4,7	32,9	35,6	48,3	47,7
Stª Clara	48,1	51,4	1,6	2,2	47,0	49,8	49,2	52,9
Manu	30,1	30,5	11,1	10,9	17,8	18,8	46,1	45,6
Rainha Santa	50,3	49,5	–	–	50,3	49,5	50,3	49,5
Rainha da Paz	40,5	40,7	7,9	5,4	34,9	36,9	46,1	44,5
Mil Doce	50,7	51,5	14,4	12,0	30,5	33,4	65,0	61,1
Rodrigo & Marques	50,1	50,2	10,0	9,5	38,1	38,7	64,6	64,6
Pistrina	46,0	46,6	6,3	5,7	40,0	40,6	54,9	53,8
Flor da Conchada	41,7	41,7	8,4	8,2	23,6	24,5	48,6	50,8
Panificadora do Centro	41,6	41,8	8,0	8,1	35,9	36,1	47,2	47,5
Pertutti	60,0	59,9	–	–	60,0	59,9	60,0	59,9
Flor de S. Martinho	55,7	56,5	2,3	3,3	53,5	54,4	58,0	60,3
Fernão Magalhães	47,7	47,5	–	–	47,7	47,5	47,7	47,5
Parque	43,2	47,0	6,5	7,6	39,2	41,8	50,7	55,7
Carrefour	42,0	46,2	5,4	5,5	38,1	42,3	45,8	50,1
Continente	25,5	26,7	–	–	25,5	26,7	25,5	26,7
Jumbo	45,7	46,4	0,8	0,9	44,5	45,8	46,4	47,7

Para um nível de significância de 0,05, os teores de cloreto em cada cidade considerada comportam-se geralmente segundo uma distribuição normal (Tabelas IV-22 e IV-23). Segundo o *Shapiro-Wilk*, os valores de *p* obtidos não foram inferiores a 0,05. Apenas as cidades de Braga, Gaia e Porto-Antas da Região Norte não cumprem este requisito.

Tabela IV-22 Valores de p do teste de normalidade de Shapiro-Wilk para $\alpha = 0,05$ (região norte).

Cidade	**Kolmogorov-Smirnov**		**Shapiro-Wilks**	
	p-value		*p-value*	
	FIA	*FCS*	*FIA*	*FCS*
Alfena	0,200	0,114	0,192	0,110
Braga	0,006	0,007	0,008	0,021
Gaia	0,007	0,034	0,010	0,017

Paços de Ferreira	-	-	0,408	0,315
Valongo	0,200	0,200	0,622	0,446
Sta Maria da Feira	0,200	0,150	0,174	0,021
Matosinhos	0,200	0,200	0,897	0,917
Vila Nova Telha	-	-	-	-
Porto - Sé	0,118	0,052	0,134	0,266
Porto - Cedofeita	0,200	0,200	0,783	0,501
Porto - Paranhos	-	-	0,130	0,742
Maia	0,200	0,200	0,688	0,770
Gondomar	0,085	0,120	0,084	0,083
Porto - Baixa	-	-	-	-
Porto - Antas	0,048	0,029	0,016	0,011

Tabela IV-23 Valores de p do teste de normalidade de Shapiro-Wilk para $\alpha = 0,05$ (região Coimbra).

Freguesia	**Kolmogorov-Smirnov**		**Shapiro-Wilks**	
	p-value		***p-value***	
	FIA	**FCS**	**FIA**	**FCS**
Olivais			0,676	0,789
Zizânia	0,200*	0,116	0,402	0,229
Diodoro	0,191	0,157	0,458	0,371
Flor do Mondego	-	-	0,724	0,684
Arco-íris	0,045	0,200*	0,031	0,167
Pingo Doce	0,200*	0,200*	0,293	0,820
Tosta Rica	0,200*	0,200*	0,296	0,339
Vasco da Gama	0,200*	0,121	0,047	0,088
Palmeira	0,200*	0,200*	0,563	0,889
Mimosa	-	-	0,205	0,446
Império	-	-	0,795	0,094
Camões	-	-	0,961	0,326
Vénus	0,200*	0,200*	0,396	0,234
Marisol	-	-	0,724	0,368
Pérola	-	-	0,332	0,250
Manu	0,200*	0,200*	0,640	0,475
Mil Doce	0,200*	0,200*	0,532	0,197
Rodrigo & Marques	0,200*	0,200*	0,964	0,853
Pistrina	-	-	0,479	0,920
Flor da Conchada	0,200*	0,200*	0,333	0,471
Flor de S. Martinho	-	-	0,975	0,086
Fernão Magalhães	-	-	0,059	0,228
Jumbo	-	-	0,442	0,048

Dado que nem todas as cidades incluídas nesse estudo apresentavam pelo menos dois locais de venda, foi necessário excluir algumas cidades deste estudo. O valor de *p* para a variância intra e inter grupos ANOVA origina também valores maiores de 0,05, iguais a respectivamente 0,627 e 0,607.

Para um nível de significância de 0,05, os teores de cloreto nas amostras parecem não ser diferentes.

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho conduziu ao desenvolvimento de um sistema FIA com detecção potenciométrica para a determinação de cloretos em pão. O estudo do comprimento do eléctrodo indicou que 1,0 cm de comprimento para o eléctrodo é suficiente para a obtenção de uma sensibilidade Nernsteniana e de uma elevada frequência analítica. As condições experimentais associadas a um menor consumo de reagente, a uma emissão menor de resíduos e que originam boas características de operacionalidade, decorrem da injecção de 300 µL num caudal de 2,5 mL min^{-1}. As leituras são efectuadas sem qualquer ajuste de pH já que o efeito deste parâmetro na resposta dos detectores não é relevante numa gama alargada de valores de pH, incluindo aqui a região de pH associada aos extractos das amostras. A selectividade do sistema estabelecido foi adequada para as amostras consideradas.

O método proposto oferece resultados comparáveis com os obtidos por dois métodos alternativos, baseados em cromatografia iónica e detecção óptica em fluxo contínuo segmentado, permitindo a análise de cerca de 60 amostras por hora.

Os teores de cloreto nas amostras de pão são estatisticamente diferentes segundo o tipo de pão. Os pães sem sal e os de meio-sal parecem ser diferentes entre si e dos restantes tipos de pão analisados. O mesmo não acontece comparando os hipermercados/padarias e as cidades. Os resultados carecem ainda de uma avaliação estatística mais profunda, já que alguns requisitos necessários foram negligenciados.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Portaria 425/98 de 25 de Julho de 1998, Fixa as características a que devem obedecer os diferentes tipos de pão e de produtos afins do pão, Diário da República - 1.ª serie B, Nº 170, 3552-3556.

[2] URL, http://spg.pt/XdI3/402926.html, acedido a 15 de Setembro de 2006.

[3] URL, http://www.brasilescola.com/curiosidades/pao-na-historia.htm, acedido em Fevereiro de 2007.

[4] Selecções do Reader's Digest - "Alimentos Bons, Alimentos Perigosos", pp 298-300, 1996.

[5] URL, http://www.confagri.pt/PoliticaAgricola/Temas/SegurancaAlimentar/Noticias/noticia2090a.htm, acedido em Fevereiro de 2007.

[6] URL, http://dn.sapo.pt/2006/06/21/boa_vida/os_diferentes_tipos_farinha.html, acedido em Março 2007.

[7] Laaksonen, T.J. et al, "Effects of ingredients on phase and state transitions of frozen wheat doughs", 2001.

[8] Penfield, M.P. et al, "Experimental Food Science", 1990.

[9] Portaria 833/89 de 22 de Setembro de 1989, Regulamenta o decreto lei nº 192/89, de 8-Jun., na parte que diz respeito a fixação dos aditivos admissíveis nos géneros alimentícios e as condições de utilização desses aditivos alimentares, Diario da República - 1.ª série, nº 219, 4227-4237.

[10] URL, http://www1.uol.com/br/vyaestelar/nutricao03.html, acedido a 17 de Setembro de 2006.

[11] URL, http://culinaria.terra.com.br/abcint/0,,OI151127-E_I149-CTS,00.html, acedido a 17 de Setembro de 2006.

[12] Munoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Perez MJ, Sanchez-Somolinos M, Rincon C, Hortal J, Pelaez T. "Saccharomyces cerevisiae fungemia: an emerging infectious disease." Clin Infect Dis. 2005, 40(11) 1625-34.

[13] Ficheiro do ISEP

[14] URL, http://www.confagri.pt/NR/exeres/440F4162-196F-4DD7-B9F6-FA55A6E300C5.htm, publicado em: 23-10-2006 09, Fonte: BBC.

[15] Antonios, T.F., et al, "Clinical Experimental Pharmacol Physiol", pp 22: 180-4, 1995.

[16] Denton, D. et al, "Nature Med", pp 1: 1009-16, 1995.

[17] Law, M.R., et al, Br Med J, pp 302:811-5, 1991.

[18] Frost, C.D., et al, Br Med J, pp 302:815-8, 1991.

[19] Law, M.R., et al, Br Med J, pp 302:819-24, 1991.

[20] Weinberger MH. The effects of sodium on blood pressure in humans. In:Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management, 2nd ed., New York: Raven Press, 1995; 2703-14.

[21] Simpson FO. Blood pressure and sodium intake. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: pathophysiology, diag¬nosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995;273-81.

[22] Weinberger, M.H., et al, Hypertension, 8 (Suppl II): 127-34, 1986.

[23] Sullivan, J.M., et al, Am J Med Sci, pp 295:370-7, 1988.

[24] Overlack, A., et al. Hypertension, pp 22:331-8, 1993.

[25] Cowley, A.W., et al, Jama, pp 275:1581-9, 1996.

[26] Cutler, J.A., et al, Hypertension, 17 (Suppl I):27-33, 1991.

[27] Midgley, J.P., et al, pp 275:1590-7, 1996.

[28] Alderman, M.H., et al, Hypertension, pp 25:1144-52, 1995.

[29] Cook, N.R., et al, Arch Intern Med, pp 155:701-9, 1995.

[30] Morris R.C., et al, "Potassium responsive hypertension", in: Laragh J.H., Brenner B.M., eds. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management, 2nd ed., New York: Raven Press, pp 2715-26, 1995.

[31] Harlan, W.R., et al, Pressure and calcium and magnesium intake, in: Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and manage¬ment, 2nd ed., New York: Raven Press, pp 1143-54, 1995.

[32] Boegehold, M., et al, Hypertension, 17(Suppl I) pp 158-61, 1991.

[33] Stewart, B.W., *et al*, eds. World Cancer Report, Lyon: IARC Press, 2003.

[34] World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington: American Institute for Cancer Research, 1997.

[35] Kono, S., *et al*, Nutrition and stomach cancer, Cancer Causes Control, 7: 41–55, 1996.

[36] Tatematsu, M., *et al*, Effects in rats of salt on experimental gastric cancers induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. J Natl Cancer Inst, 55: 101–6, 1975.

[37] Takahashi, M., *et al*, effects of dietary salt on both initiation and promotion stages of rat gastric carcinogenesis, Princess Takamatsu Symp, 16: 169–82, 1985.

[38] International Agency for Research on Cancer, Schistosomes, Liver Flukes, and Helicobacter pylori. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, 61. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1994.

[39] Helicobacter and Cancer Collaborative Group, Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case-control studies nested within prospective cohorts, 49: 347–53, 2001.

[40] URL, http://www.nap.edu, acedido em Fevereiro 2007.

[41] Cauvain, S.P. *et al*, "Technology of Breadmaking", Blackie Academic and Professional", pp 262 - 295, 1998.

[42] Kowaslki, M.B. *et al*, 2002.

[43] James, W.P.T.J., *et al*, "Helath Nutririon. Preventing Nutrition-Relating Disease in Europe", WHO Regional Public European Series, No.24, 1988.

[44] Sucman, E., *et al*, Can. J. Anal. Sci. Spectrosc, 2002.

[45] Lima, J.L.F.C., *et al*, Cienc. Technol. Aliment, 2000.

[46] Vieira, J.A., *et al*, J. Braz. Chem. Soc. 14, pp 259, 2003.

[47] Morais, S., *et al*, "Evaluation of the dialysing yield of membranas with different composition. Application to the analysis of Chloride in fruit juices by flow injection, J. Braz. Chem. Acta 353, pp 245 - 254, 1997.

[48] Miró, M., *et al*, " A novel flow-through microdialsys separation unit with integrated differential potenciometric detection for the determination of chloride in oil samples", Analyst 128, pp 1291-1297, 2003.

[49] Climent, M.A., *et al*, Lopez-Atalaya, Cement Concr. Res. 29 (6), pp 893, 1999.

[50] Araújo, A.N., *et al*, Fresenius J. Anal. Chem. 351, pp 614, 1995.

[51] Valcarcel M., *et al*, "Flow Injection Analysis. Principles and Applications", Chalmers R. A., Masson M., Miller J. N., editores. Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 1997.

[52] Gonçalves, M.L.S.S., "Métodos Instrumentais para Análise de Soluções", 3ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

[53] Zenki, M., *et al*, "Repetitive determination of chloride using the circulation of the reagent solution in closed flow-through system", Talanta 58, pp 1055-1061, 2002.

[54] Silva, C.R., *et al*, "Flow injection spectrophotometric method for chloride determination in natural waters using Hg(SCN)2 immobilized in epoxy resin", Talanta 65, pp 965-970, 2005.

[55] Chalk, S.J., *et al*, "Determination of chloride by flow injection spectrophotometry with membrane reagent introduction", Anal. Chem. Acta 366, pp 147-153, 1998.

[56] Jing-fu, L., *et al*, "Evaluation of a reagent-injection flow injection technique for sample background absorption elimination: determination of chloride in cigarettes", Talanta 54, pp 329-332, 2001.

[57] van Staden, J.F., *et al*, "On-site monitoring of chloride in milk with a dialyser UV/Vis spectrophotometer/ flow injection system", S.Afr.J.Chem 52(4), 1999.

[58] Morais, S., *et al*, "Evaluation of the dialysing yield of membranes wiyh different composition. Application to the analysis of chloride in fruit juices by flow injection", Anal. Chim. Acta 353, pp 245-254, 1997.

[59] van Staden, J.F., *et al*, "Spectrophotometric determination of chloride in mineral and drinking waters using sequential injection analysis", Fresenius J. Anal. Chem. 371, pp 396-399, 2001.

[60] Velasco-Arjona, A., *et al*, "Full automated robotic method for the determination of chloride, nitrite and nitrate in cured meat products", Talanta 46, pp 969-976, 1998.

[61] Pimenta, A.M., *et al*, "Chloride-selective membrane electrodes and optodes based on na indium(III) porphyrin for the determination of chloride in a sequential injection analysis system", Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36, pp 49-55, 2004.

[62] Kumar, S.D., *et al*, "Determination of Chloride in Nuclear-Grade Boron Carbide by Ion Chromatography", Chromatographia 59, pp 243-245, 2004.

[63] Morales, J.A, *et al*, "Determination of chloride, sulphate and nitrate in groundwater samples by ion chromatography", Journal of Chromatography A, 884, pp 185-190, 2000.

[64] Zhou, M., *et al*, "Simultaneous determination of chloride, nitrate and sulphate in vegetable samples by single-column ion chromatography", Microchemical Journal 65, pp 221-226, 2000.

[65] Ivask, J., *et al*, "Analysis of ions in polar ice core samples by use of large injection volumes in ion chromatography", Journal of Chromatography A, 770, pp 125-127, 1997.

[66] Agüero, E.L., *et al*, "Ion Chromatographic Determination of Chloride in Mustard Sauces", J. Agric. Food Chem. 47, pp 4682-4685, 1999.

[67] Zanella, R., *et al*, "Determination of chloride and sulphate in pore solutions of concrete by ion chromatography", J. Sep. Sci 24, pp 230-231, 2001.

[68] Deng, Y., "Determination of Major Inorganic Anions in Rainwater by Capillary Electrophoresis", 1997.

[69] Valsecchi, S., *et al*, "Determination of anions in rainwater by capillary electrophoresis with conductivity detection", Journal of Chromatography A, 760, pp 326-332, 1997.

[70] Sirén, H., *et al*, "Environmental water monitoring by capillary electrophoresis and result comparison with solvent chemistry techniques", Journal of Chromatography A, 957, pp 17-26, 2002.

[71] Pereira, E. A., *et al*, "Indirect determination of chloride and sulfate ions in alcohol fuel by capillary electrophoresis", Anal. Bioanal. Chem. 380, pp 178-182, 2004.

[72] Andrade-Eiroa, A., *et al*, "Determination of chloride by multisyringe flow injection analysis and sequential injection analysis with potentiometric detection", Anal. Chim. Acta 467, pp 25-33, 2002.

[73] Pérez-Olmos, R., *et al*, "Sequential potenciometric determination of chloride and nitrate in meat products", Food Chem. 59 (2), pp 305-311, 1997.

[74] Fernandes, J.C.B, *et al*, "Simultaneous Determination of Chloride and Potassium in Carbohydrate

Electrolyte Beverages Using na Array of Ion-Selective Electrodes Controlled by a Microcomputer", J. Braz. Chem. Soc. 11(4), pp 349-354, 2000.

[75] Hara, H., *et al*, Anal. Chem. 58, 1502, 1986.

[76] Climent, M.A., *et al*, Lopez-Atalaya, Cement Concr. Res. 29 (6), 893, 1999.

[77] Vieira, J.A., *et al*, J. Braz. Chem. Soc. 14, 259, 2003.

[78] Calatayud M., "Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals", Automation in the Laboratory, Parte 5, Electroanalytical Methods. Capítulo 14, Potentiometry. Taylor & Francis Limited, London, United Kingdom, 1996.

[79] Silva, I.S.S., *et al*, "FIA-potenciometry in the sub-Nernstian response region for rapid and direct chloride assays in milk and in coconut water", Talanta 67 (2), pp 651-657, 2005.

[80] Ganjali, M.R., *et al*, "Ruthenium(III) Schiff´s Base Complex as Novel Chloride Selective Membrane Sensor", 2004.

[81] Frant *et* Ross.

[82] Raluca I. S., *et al*, "Ion-selective membrane electrodes in pharmaceutical analysis", Critical Reviews in Analytical Chemistry, 27, pp 307-321, 1997.

[83] van Staden, J.F., " A coated tubular solid-state chloride-selective electrode in flow injection analysis", Anal. Chim. Acta, 179, pp 407-417,1986.

[84] Iupac, International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division Commission on Electroanalytical Chemistry, BUCK R. P., LINDNER E., Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes. Pure Appl. Chem., 66, pp 2527-2536, 1994.

[85] Castro, M. D. L., *et al*," Flow injection analysis of pharmaceuticals", J. Pharm. Biomed. Anal., 7, pp 1291-1300, 1989.

[86] Valcarcel M., *et al*, "*Flow Injection Analysis. Principles and Applications",* Chalmers R. A., Masson M., Miller J. N., editores, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 1987.

[87] Shpigun I. K., "*Reviews on Analytical Chemistry* "– *Euroanalysis VIII, Edinburg, UK, 1993. "Flow injection analysis with ion-selective electrodes: recente developments and applications*", Littlejohn D., Burns D. T., editores. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 246-272, 1994.

[88] Solich P., *et al*, "Construction of a diflusinal ion sensor and its use in automated flow-injection methods for assay, content uniformity, and dissolution studies in formulations". J. Pharm. Sci., 84, pp 889-894, 1995.

[89] Ferreira I. M. P. L. O., *et al*, "Tubular electrodes and other devices for potentiometric detection in FIA", J. Flow Injection Anal., 10, pp 17-32, 1993.

[90] Sales, M.G.F, "Desenvolvimento de detctores tubulares potenciométricos e de metodologias automáticas de fluxo continuo com detecção potenciométrica destinados ao control de produtos farmacêuticos", 1999.

[91] Ruzicka J., *et al,*. "Flow injection analysis. Part VII. Use of ion-selective electrodes for rapid analysis of soil extracts and blood serum. Determination of potassium, sodium and nitrate." Anal. Chim. Acta, 88, pp 1-16, 1977.

[92] Hansen E. H., *et al.*, "Flow injection analysis of environmental samples for nitrate using an ion-selective electrode. Analyst, 102, pp 705-713, 1977.

[93] Alegret S., *et al*, "Flow-through sandwich PVC matrix membrane electrode for flow injection analysis", Anal. Lett., 18, pp 2291-2303, 1985.

[94] Lima J. L. F. C., " Alguns aspectos da evolução e desenvolvimento de eléctrodos selectivos de ião", Revista Portuguesa de Farmácia, XXXVII, pp 71-77, 1987.

[95] Meyerhoff M. E., *et al*, " An ion-selective electrode/flow-injection analysis experiment. Determination of potassium in serum". J. Chem. Ed., 60, pp 766-768, 1983.

[96] Frend A. J., *et al*," Flow injection analysis with tubular membrane ion-selective electrodes in the presence of anionic surfactants", Analyst, 108, pp 1357-1364, 1983.

[97] Alegret S., *et al*, "Construction of equipment for potentiometric determination in flow injection analysis", Quim. Anal., 6, 278-292, 1987.

[98] Alonso J., *et al*, " Flow-through tubular PVC matrix membrane electrode without inner reference solution for flow injection analysis". Anal. Chim. Acta, 164, pp 147-152, 1984.

[99] Calatayud M., "Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory. Parte 5, Electroanalytical Methods". Capítulo 14, Potentiometry, Taylor & Francis Limited, London, United Kingdom, 1996.

[100] Trojanowicz M., *et al*, " Potentiometric flow-injection determination of chloride", Anal. Chim. Acta, 151, pp 77-84, 1983.

[101] Kim, M., "Determining citrate in fruit juices using a biosensor with citrate lyase and oxaloacetate decarboxylase in a flow injection analysis system", Food Chemistry, 99,pp 851-857, 2006.

[102] Stein, K., *et al*, "Determination of L-asparagine using flow-injection systems with spectrophotometric and potentiometric detection", Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 364 (3), pp 266-269, 1999.

[103] Jimenez, C., *et al*, "Development of a multiparametric analyser based on ISFET sensors applied to process control in the wine industry", Sensors and Actuators B-Chemical The Netherlands, 89 (1-2) pp 199-204, 2003.

[104] Lima, J. L. F. C., *et al*, "Determining of citric acid in soft drinks using flow injection with potenciometric detection", Analytica Chimica Acta 336, 99,pp 851-857, 2006.

[105] Ferreira, I. M. P. L. V. O., et al, "Flow injection titration of chloride in food products with a silver tubular electrode based on an homogeneous crystalline membrane", Food Chemistry, 50, pp 423-428, 1994.

[106] Singh, A. K., *et al*, "Chromium (III) selective membrane sensors based on Schiff bases as chelating ionophores", Analytica Chimica Acta, 585, pp 171-178, 2006.

[107] Cao, J., *et al*, "Fluoride levels in various black tea commodities: Measurement and safety evaluation", Food and Chemical Toxicology, Volume 44, pp 1131-1137, 2006.

[108] Kim, N., *et al*, "Application of a taste evaluation system to the monitoring of *Kimchi* fermentation", Biosensors and Bioelectronics, 20, pp 2283-2291, 2005.

[109] Rotariu, L., et al, "New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic

beverages", Analytica Chimica Acta, 513, pp 119-123, 2004.

[110] Upreti, P., *et al*, "Glass and polymeric membrane electrodes for the measurement of pH in milk and cheese", Talanta, 63, pp 139-148, 2004.

[111] Miller-Ihli, N., J., *et al*, "Fluoride content of municipal water in the United States: what percentage is fluoridated?", Journal of Food Composition and Analysis, 16, pp 621-628, 2003.

[112] Clark G. D., Hungerford J. M., Christian G. D. (1989). Optimization of confluent mixing in flow injection analysis. Anal. Chem., 61, 973-979.

[113] Ranger, C., Anal. Chem., 53, pp 20A, 1981

[114] URL, http://web.educom.pt/fq/tabelas/solubilidade.htm, acedido a 20 de Agosto de 2007.

VII. ANEXOS

ANEXO I
Procedimento do método de comparação

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Delegação do Porto

Centro de Qualidade Hídrica

Procedimento

- Ligar todos os módulos do fluxo contínuo segmentado com excepção do módulo do amostrador (FCS-12).
- Ligar também o módulo do banho (FCS-13) e pressionar no botão run/stop para o banho estabilizar à temperatura pretendida.
- Ligar o fotómetro correspondente.
- Mudar tubo da agulha conforme parâmetro a analisar.
- Coloca-se a célula de 50mm na cabeça do fotómetro e o respectivo filtro (650 nm).
- Alterar o canal conforme a gama de trabalho. Para gama baixa usar canal 3 e para gama alta canal 4.
- Conforme o tipo de corrida a realizar substituir os tubos antes e depois da bomba peristáltica, nomeadamente os assinalados com "MBAS H" para gama alta e "MBAS L" para gama baixa.
- Fazer correr clorofórmio no sistema até que este passe na célula do fotómetro.
- Ligar o amostrador e fazer passar os reagentes (na gama baixa não introduzir tubo da água destilada).
- Deixa-se estabilizar o sistema até obtenção de um fluxo perfeitamente segmentado e uma linha de base estável.
- Prepara-se o prato contendo os padrões, brancos e as amostras para a análise, segundo a ordem:

  T ⇒ *tracer* (corresponde ao padrão mais alto de cada gama de trabalho)

  wi ⇒*wash ignore*

  s0⇒ *standard* 0

  s1⇒ *standard* 1

  s2⇒ *standard* 2

  s3⇒ *standard* 3

  s4⇒ *standard* 4

  s5⇒ *standard* 5

s6⇒ *standard* 6

.....

D⇒ *Drift* (corresponde ao padrão do meio da curva)

wi⇒*wash ignore*

W⇒ *wash*

U⇒ *p.controlo e amostras*

- Segue-se o número de amostras que se pretende analisar, intercaladas de uma amostra de água, um *drift*, um *wash* e um padrão de controlo correspondente à concentração do drift, independente do padrão da recta de calibração, até ao fim da corrida; as últimas amostras a serem colocadas são uma água, um padrão de controlo, uma água, um *drift* e uma RW (*Run wash*).

- Após as linhas de base estar estável fazer o correr o padrão mais alto durante 10 minutos.
- Ver se alinha de base volta a estabilizar, se não acertar a mesma linha para 20 unidades digitai rodando o botão "fine" do fotómetro.
- Iniciar a corrida no software e ao mesmo tempo carregar no botão start do amostrador.

Paragem do Sistema

- Após terminar a corrida retirar os tubos dos reagentes e fazer passar nos mesmos água destilada durante 15 minutos, desligando o amostrador nessa altura;
- Retirar os mesmos da água e fazer passar ar até que a célula contenha apenas clorofórmio;
- Retirar o tubo do clorofórmio e fazer passar ar até que os tubos estejam secos;
- Desligar a bomba.

Utilização do Software

Teclas Importantes

Enter	Concede o acesso às funções seleccionadas com o cursor, activar e desactivar grupos de trabalho, parâmetros e ficheiros de corridas.
Esc	Permite retroceder ao passo anterior, podendo retroceder vários

passos consecutivos. Premir para chegar aos menus.

⇤ F7	No sub–menu "Control Panel" permite seleccionar as três áreas de trabalho ("Analysis Panel", "Channel Panel", "Data Handling Panel") e passar de umas áreas para outras.
↑ ↓ → ←	Permite mover o cursor para cima, para baixo, para direita e esquerda, respectivamente.
F1	Dá acesso ao menu de instruções.

Seleccionar grupo de trabalho/parâmetros e iniciar corrida

- A seguir a C:\Skalar> escrever "start" e carregar no "Enter". Aparece uma janela com os quatro menus "Control Panel", "Graphics", "Files" e "Options" abrindo o programa directamente no sub – menu "Control Panel" do menu "Control Panel".
- Escolher na janela "Analysis Panel" do sub –menu "Control Panel" o grupo de trabalho. Inicialmente aparecem todos activados com o símbolo ►.

É necessário desactivar e deixar apenas o grupo a analisar com as teclas ↑ ↓ e carregando no "Enter".

Nota: Dentro do sub menu "Control Panel" aparece no contorno da janela que está seleccionada a cor azul;

- Com a tecla ⇤ passar para o sub-menu "Channel Panel" e seleccionar o parâmetro ou gama de trabalho a analisar.
- No sub – menu "Control Panel" carregar na tecla →, seleccionar o start e carregar em "Enter". Surge um quadro onde temos de preencher o nome do operador e nome da tabela já criada (ver 3.3.3).
- Carregar em "Enter" (2vezes) e a corrida tem início aparecendo em frente ao parâmetro em estudo *Analysis*. No mesmo instante carregar no botão start do amostrador.
- Para a evolução da corrida em tempo real ir ao menu "Graphics" e carregar em "Enter". Seleccionar "Real Time" e carregar em "Enter".

Ver curva de calibração e resultados ao longo da corrida

1. Para ver curva de calibração ao menu "Graphics". Escolher a opção "Calibration Curve" e clicar em "Enter".

2. Para ver os picos de todas as análises feitas ao longo da corrida ir ao menu "Graphics" e carregar em "Enter", seleccionar o item "Edit" e carregar em "Enter". Surge um pequeno quadro para escrever a partir de que número queremos ver os picos, carrega em "Enter" ou apenas carregar em "Enter" e surgem os picos desde o início da corrida.
3. Os resultados quantitativos surgem sob a forma de tabela. Para visualizar esses resultados vamos ao sub-menu "Control Panel", clicamos na tecla [→] e escolhemos a parâmetro "Load" e carregamos em "Enter"para descarregar a corrida que pretendemos. Surge um quadro que diz "Auto-calculation", clicar em "Enter", aparece outro que diz "File Name" e fazemos "Enter" novamente. Seleccionamos a pasta onde estão os ficheiros relativos ao parâmetro que estamos a analisar, "Enter" e seleccionamos o ficheiro que está gravado com a data do dia em que a corrida foi efectuada.

Nota: Se efectuarmos mais de uma corrida no mesmo dia, os ficheiros além da data apresentam a letra A, B, C, e assim sucessivamente conforme o número de corridas.

Criar e Editar Tabela

- Ir ao menu "Files", seleccionar a opção "Table" e clicar em "Enter".
- Seleccionar "Create" e carregar em "Enter".
- Introduzir o nome da tabela e carregar em "Enter".
- Surge a tabela no écran do computador onde é necessário preencher a tabela com a posição da amostra no amostrador em "Pos", tipo de amostra em "Type" (ver 3.1), identificação da amostra em "Identity" e a diluição em "Dil".
- Para editar tabela já criada ir ao menu "Files", seleccionar a opção "Table" e clicar em "Enter".
- Seleccionar "Edit" e carregar em "Enter".
- Carregar novamente em "Enter", onde surgem todas as tabelas já criadas, seleccionar a pretendida e clicar em "Enter".

Nota: Pode ser alterado qualquer parâmetro na tabela.

Imprimir e desligar software

- Para imprimir curva de calibração entrar no menu "Graphics", seleccionar "calibration curve" e carregar em "Print Screen" no teclado do computador.
- Para imprimir picos da corrida entrar no menu "Graphics", seleccionar "Edit" e carregar em "Print Screen" no teclado do computador.

- Para desligar o programa ir ao Menu "Files" , seleccionar o item "Quit Program" carregar no "Enter". Surge no ecran *C:\ SKALAR>* e escrever em frente REMOVE e clicar em "Enter". Surge um quadro e deslocamos o cursor para o REMOVE, fazer "Enter". Desligar o computador.