



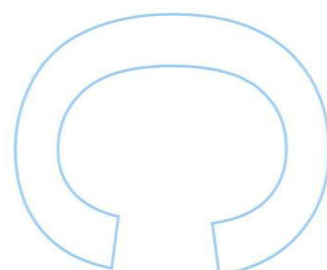
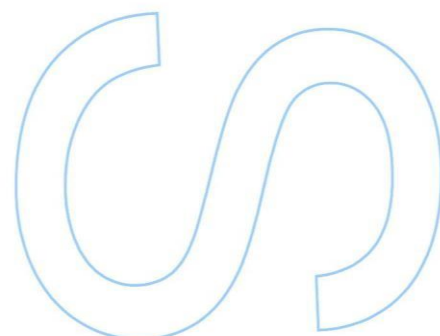
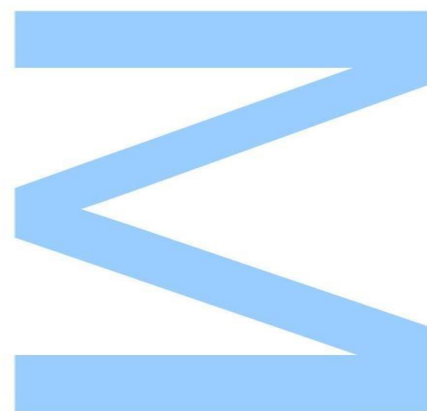
Acrilamida em Bolachas: Otimização e Aplicação da Metodologia de Análise

Cristiana Lima Fernandes

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Departamento de Química e Bioquímica

2016



Acrilamida em Bolachas: Otimização e Aplicação da Metodologia de Análise

Cristiana Lima Fernandes

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Departamento de Química e Bioquímica
2016

Orientação:

Luís Guilherme de Lima Ferreira Guido

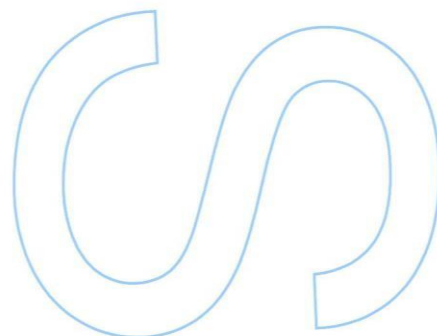
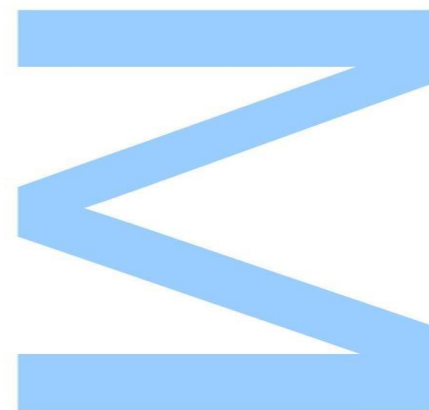
Professor Auxiliar

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Co-orientação:

Cláudia Teixeira Lopes

Cerealis Produtos Alimentares, S.A.





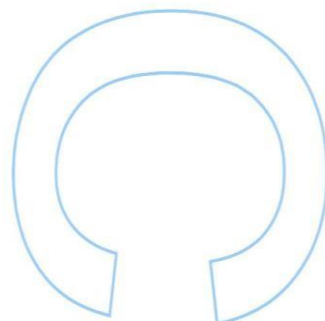
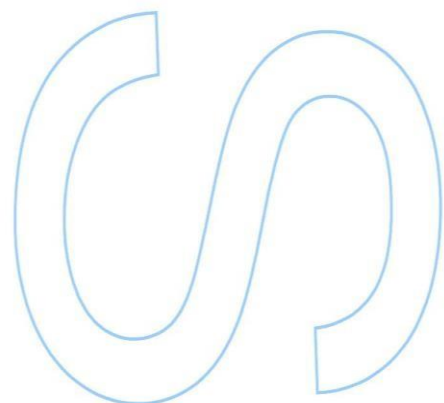
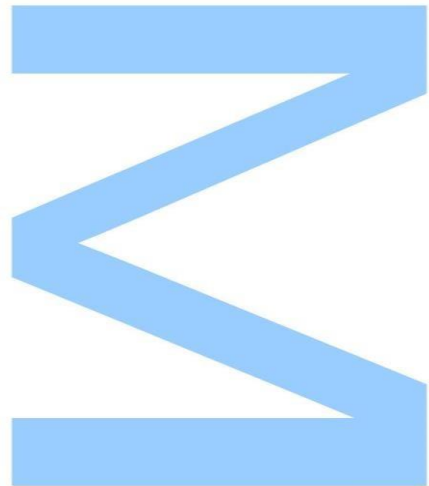
Universidade do Minho

Todas as correções determinadas pelo júri,
e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto,

____/____/____



Agradecimentos

Durante este trabalho enfrentei algumas dificuldades, pelo que não seria possível a sua realização sem as pessoas a quem agradeço:

Ao Professor Luís Guido pelo interesse demonstrado neste trabalho, e pela orientação dada ao longo do estágio. Ao Daniel Carvalho pela ajuda no laboratório.

À Eng.^a Cláudia Lopes por ter sugerido o tema do trabalho e pelo seu apoio durante o estágio. À Margarida e à Cátia pelas ajudas e sugestões.

A vocês, pais, por tudo, e por sempre me incentivarem a estudar mais e mais.

A ti, irmã, pelas nossas vivências e por seres como és.

A ti, avó Olívia, por nos inspirares a todos com a tua luta e persistência.

A ti, Bruno, por me apoiares e ajudares em tudo neste último ano e, principalmente, por compreenderes sempre tudo e me incentivares a continuar.

A vocês, Té, Marta e Gonçalo, por me acompanharem sempre.

A ti, Sílvia Fernandes, por me acompanhares neste mestrado e pela tua amizade.

A ti, Ângela Ferreira, pela ajuda, mesmo à distância.

Aos restantes meus amigos, em especial às “Saras” e Tinoco, que sempre estão presentes na minha vida.

FCUP
II

Índice

Agradecimentos	I
Índice	III
Índice de Figuras.....	IV
Índice de Tabelas	V
Resumo	VII
Abstract.....	VIII
Resumé	IX
Abreviaturas.....	XI
1. Introdução.....	1
1.1 Cerealis – Apresentação da empresa.....	1
1.2 Toxicidade e Exposição à Acrilamida	3
1.3 Formação em alimentos	9
1.4 Produção industrial de bolachas e caracterização do processo	11
1.5 Fatores que influenciam a formação de acrilamida em bolachas.....	14
1.6 Métodos de deteção e quantificação da acrilamida em bolachas	16
1.7 Objetivos do trabalho.....	19
2. Parte Experimental	21
2.1 Amostragem.....	21
2.2 Análise do teor de humidade.....	22
2.3 Análise da cor	22
2.4 Reagentes	24
2.5 Solventes	24
2.6 Equipamentos e Material	24
2.7 Soluções.....	25
2.8 Preparação dos extratos de bolacha	26
2.9 Condições cromatográficas.....	28
2.10 Tratamento estatístico dos resultados	29
3. Resultados e Discussão	31
3.1 Reta de calibração.....	31
3.2 Repetibilidade	34
3.3 Análise da cor	35
3.4 Teor de humidade	36
3.5 Teor de asparagina das matérias-primas	37
3.6 Teor de acrilamida nas bolachas.....	37
3.7 Correlação do teor de acrilamida com as restantes variáveis monitorizadas	40
4. Conclusão	45
5. Referências Bibliográficas	47

Índice de Figuras

1.1: Organização do grupo Cerealis; adaptado de Cerealis (2016)	2
1.2: Fórmula química da acrilamida	4
1.3: Vias de formação de acrilamida (A) via da asparagina (B) via lipídica (Yi Xua 2014)	10
1.4: Contribuição dos grupos alimentares (%) para a exposição à AA na população Holandesa (Polly E. Boona <i>et al.</i> 2005)	10
1.5: Esquema das etapas da produção industrial de bolachas	12
1.6: Teor médio de acrilamida em diferentes tipos de bolachas; adaptado de (EFSA 2012)	16
2.1: Esquema do forno de cozedura e zonas do forno (1, 2 e 3)	20
2.2: Esquema das várias zonas do forno	20
2.3: Esquema da recolha de amostras no tapete do forno; as setas indicam o sentido da produção de bolachas	21
2.4: Preparação dos extratos de bolacha	24
2.5: Primeira extração em fase sólida (SPE) – HLB Oasis	25
2.6: Segunda extração em fase sólida (SPE) – Bond Elut	25
3.1: Cromatograma da solução de acrilamida 100 ng/ml	28
3.3: Reta de calibração para diferentes concentrações de AA	29
3.4: Exemplo de cromatograma de bolacha A	29
3.5: Diferentes tonalidades de cor de uma referência de bolacha analisada com informação dos teores de acrilamida	30
3.6: Teor médio de acrilamida nas bolachas A, B, C e D (exceto zona “Forno 3”)	32
3.7: Teores de acrilamida distribuídos por zonas de amostragem	35
3.8: Análise PCA às variáveis com 2 pontos de Amostragem (“margens” e “centro”)	38

Índice de Tabelas

1.1: Valores indicativos de Acrilamida para diferentes produtos alimentares (adaptado de UE 2013)	7
1.2: Concentração de AA em alguns grupos alimentares; n: número de amostras; (adaptado de EFSA, 2015)	11
1.3: Temperaturas e tempos de cozedura do forno de cozedura das bolachas a) parâmetro b) no momento de recolha da amostra	12
1.4: Teores de humidade das bolachas	12
1.5: Matérias-primas e validade das bolachas analisadas	13
2.5: Preparação das soluções padrão de acrilamida	23
2.6: Preparação das soluções padrão de acrilamida deuterada (padrão interno)	23
2.7: Preparação das soluções de calibração	23
Tabela 3.1: Concentrações e áreas dos picos da acrilamida e acrilamida-d3 para delineação da reta de calibração de gama alta	46
Tabela 3.2: Dados dos ensaios de repetibilidade	48
Tabela 3.3: Resultados do ensaio de repetibilidade	48
Tabela 3.4 - Análise da cor das bolachas com recurso ao colorímetro (L – luminosidade, a – vermelho, b – amarelo); os valores apresentados representam a média de três análises independentes	49
Tabela 3.5: Teores de humidade nas bolachas por zona de amostragem	50
Tabela 3.6: Concentrações de asparagina na farinha de trigo e na sêmea de trigo, utilizadas no fabrico de bolachas	51
Tabela 3.7: Teores de acrilamida nas bolachas distribuídos por zonas de amostragem	52
Tabela 3.8: Melhor conjunto de variáveis explicativas por análise MLR às 6 variáveis; F1: tipo de bolacha (A, B, C ou D) F2: posicionamento no tapete do forno	54
Tabela 3.9: Correlação de <i>Pearson</i> com 2 pontos de amostragem	55
Tabela 3.10: Melhor conjunto de variáveis explicativas por análise MLR a dois pontos de amostragem (“margens” e “centros”)	57

FCUP
VI

Resumo

A presença de compostos tóxicos em alimentos sujeitos a elevadas temperaturas é cada vez mais uma preocupação. A acrilamida (AA) é uma molécula que se forma facilmente em alimentos ricos em hidratos de carbono, como as bolachas e cereais de pequeno-almoço, a temperaturas superiores a 120°C. Foi descoberta em alimentos pela primeira vez por Tareke *et al.* (2002) e, desde essa data, que a indústria alimentar, os Estados-Membros e a Comissão Europeia, têm desenvolvido esforços consideráveis na investigação das vias de formação da acrilamida e na redução dos teores deste composto químico nos alimentos transformados. Esta descoberta causou algum alarme e, conseqüentemente, bastante pressão sobre a indústria alimentar no sentido de realizar investigações acerca do teor de acrilamida nos seus produtos alimentares. Assim, é eminente a necessidade de quantificar o teor de acrilamida em produtos finais de indústrias alimentares, por forma a delinear limites e estratégias de mitigação.

A nível científico, existe ainda pouco conhecimento sobre os níveis de acrilamida nos alimentos, bem como sobre os métodos para detetar e quantificar, não havendo qualquer método laboratorial certificado para o efeito. Neste contexto, o primeiro objetivo deste trabalho foi otimizar e aplicar um método de deteção e quantificação da acrilamida em matrizes alimentares de bolachas, através da análise por LC-MS/MS, usando ionização por *electrospray* e o *Orbitrap* como analisador de massas. O método de análise demonstrou apresentar boa repetibilidade, avaliada através do coeficiente de variação de 11,13%.

Seguidamente, pretendeu-se comparar os teores de acrilamida com matérias-primas, tempo/temperatura de cozedura, posicionamento no tapete de cozedura e cor de quatro bolachas diferentes. Os resultados para a concentração de AA obtidos situaram-se entre 323,67 e 2056,11 µg/kg. Ao longo da cozedura foi observado um aumento da concentração da acrilamida, assim como se observaram diferenças entre as amostras colhidas em zonas distintas do tapete de cozedura. A composição das matérias-primas das bolachas foi o fator estatisticamente mais correlacionado com o teor de AA quando consideradas todas as amostras. Quando analisadas apenas as amostras finais (bolachas totalmente cozidas), a componente de cor *L* (Luminosidade) foi a variável que melhor se correlacionou com o teor de acrilamida nas bolachas. O teor de humidade foi a segunda variável que melhor se correlacionou, numa correlação inversa, com o teor de acrilamida. Embora os resultados não sejam estatisticamente significativos, são uma importante previsão dos fatores de influência na formação de AA em bolachas, para o desenvolvimento de estratégias de mitigação.

Palavras-chave: Acrilamida; Bolachas; Asparagina; Cromatografia Líquida; Espectrometria de Massa.

Abstract

The presence of toxic compounds in foods subjected to high temperatures is becoming a concern. Acrylamide is a molecule which is easily formed in food rich in carbohydrates, such as cookies, and breakfast cereal, at temperatures above 120 ° C. It was firstly discovered in foods by Tareke *et al.* (2002). Since then, the food industry, Member States and the European Commission have made considerable efforts in research on acrylamide formation routes and reducing the levels of this substance in processed foods. This discovery caused some alarm and immediately enough pressure on the food industry in order to conduct research on the acrylamide content in their food products. Thus, it is eminent the need to detect and quantify the acrylamide content in the final products of food industry, in order to delineate the limits and mitigation strategies.

Regarding scientific community, there is little knowledge about the levels of acrylamide in food, as well as methods to determine their quantification, and there is no laboratory method certified to such purpose. In this context, the first goal of this study was to optimize and apply a method of analysis and quantification of acrylamide compound for specific food matrices of cookies, by using LC-MS/MS with electrospray ionization and *Orbitrap* as mass analyser. The developed analytical method showed good repeatability, with a coefficient of variation of 11.13% (254.09 to 292.02 µg / kg).

Then, it was intended to compare the acrylamide levels in raw materials, time/cooking temperature, positioning the cooking and color mat four different cookies. Results for AA concentration obtained vary between 323.67 and 2056.11 µg / kg. During cooking it was observed an increase in acrylamide concentration, as well as between samples taken from different areas of the baking belt. The composition of the raw materials of the cookies was statistically the most correlated factor with the AA content when considered all samples. When we analyzed only the final samples (fully baked cookies), L color component (brightness) was the variable most strongly correlated with the level of acrylamide in crackers. The moisture content was the second variable, inversely correlated with the acrylamide content. Although the results are not statistically significant, the statistical treatment presented herein enables an important prediction of factors influencing AA formation in cookies for development of mitigation strategies.

Keywords: Acrylamide; Cookies; Asparagine; Liquid Chromatography; Mass spectrometry.

Resumé

La présence de composés toxiques dans les aliments qui sont sujets à des températures élevées est de plus en plus inquiétante. L'acrilamide (AA) est une molécule qui se forme facilement dans les aliments riches en hydrates de carbone, tels que les biscuits et céréales de petit-déjeuner, à des températures supérieures à 120°. L'AA a été découverte pour la première fois par Tareke, et. al. en 2002. Depuis, l'industrie alimentaire, les États-membres et la Commission Européenne, se sont intéressés à la recherche des voies de formation de l'AA et à la réduction de ce composant chimique dans les aliments transformés. Cette découverte, qui était l'objet d'inquiétude, a causé beaucoup de pression à l'industrie alimentaire que, à son tour, a fait des recherches sur la quantité d'AA dans leurs produits alimentaires. La nécessité de quantifier l'AA sur les produits finaux de l'industrie alimentaire s'avère, donc, essentielle. Cela permettra d'établir des limites et des stratégies de réduction et prévention.

Actuellement, les niveaux d'AA dans les aliments sont, scientifiquement, méconnus. Les méthodes de détection et quantification sont également peu expérimentées. Il n'existe pas de méthode de laboratoire certifiée pour cela. Dans ce contexte, le premier objectif de ce mémoire était d'optimiser et d'utiliser une méthode de détection et quantification de l'acrilamide dans des matrices alimentaires des biscuits. L'analyse a été faite par LC-MS/MS, en utilisant l'ionisation par électrospray et l'Orbitrap pour analyser les masses. La méthode d'analyse s'est révélée efficace avec un coefficient de variabilité de 11,13%.

Par la suite, nous avons souhaité comparer la quantité d'AA avec les matières premières, le temps/température de cuisson, le positionnement dans le tapis de cuisson et la couleur de quatre biscuits différents. Les résultats de concentration de l'AA se sont situés entre 323,67 et 2056,11 µg/kg. Nous avons observé, tout au long de la cuisson, une augmentation de la concentration d'AA. En ce qui concerne la localisation des aliments sur le tapis de cuisson, elle a révélé différentes concentrations d'AA. En comparant tous les échantillons, le facteur où la corrélation variable/quantité d'AA était la plus significative était la composition des matières premières. En ce qui concerne l'analyse des échantillons finaux (les biscuits cuits), nous avons observé que la couleur L (luminosité) était la variable la meilleure liée avec la quantité d'acrilamide dans les biscuits. Nous avons constaté que l'humidité était la deuxième variable plus significative, démontrant une corrélation inversée avec la quantité d'acrilamide. Malgré le fait que les résultats ne soient pas statistiquement significatifs, ils pointent la probable influence de certains facteurs dans la formation d'AA dans les biscuits. Ceci peut permettre le développement de stratégies de prévention et réduction d'AA dans les aliments.

Mots-clés: Acrilamide; Biscuits; Asparagine; Chromatographie Liquide; Spectrométrie de Masse.

FCUP
X

Abreviaturas

AA	Acrilamida
AND	Adenosina Difosfato
AFSCA	Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire
AFSSA	L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
EFSA	European Food Security Authority
EUFIC	European Union Food Information Council
FAO	Food and Agriculture Organization
GA	Glicidamida
GC	Gas Chromatography
GSH	Glutathione
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography with Diode-array Detection
HPLC-MS/MS	High Performance Liquid Chromatography with <i>tandem</i> Mass Spectrometry
IARC	International Agency for Research on Cancer
LC	Liquid Chromatography
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Espectrometria de Massa em <i>Tandem</i>
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
NOEL	No Observed Effect Level
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
UPLC-MS/MS	Ultra-Performance Liquid Chromatography with <i>tandem</i> Mass Spectrometry
WHO	World Health Organization

1. Introdução

1.1 Cerealis – Apresentação da empresa

A Cerealis foi fundada em 1919 como “Amorim Lage Lda.” por José Alves de Amorim e Manuel Gonçalves Lage. Esta empresa familiar era uma indústria de moagem de trigo e produção de farinhas de trigo para panificação, instalada em Águas Santas, Maia, no Porto, Portugal. Em 1933 a empresa inaugurou uma fábrica de massas com a criação de marca *Milaneza*. Nos anos que se seguiam a empresa aumentou a produção, e deu-se a ampliação e modernização de instalações. Em 1958 foi a primeira fábrica de pão com forno contínuo e, em 1960, lançou o primeiro pão de forma português, cortado e embalado. Em 1978, a fábrica de pão foi convertida em fábrica de bolachas *Milaneza*. Com a aquisição da *Nacional* em 1999, a “Amorim Lage” aumentou a sua dimensão, tornando-se o maior grupo português na área da transformação de cereais para consumo humano. Devido ao crescimento exponencial, em 2005 houve uma reestruturação de Amorim Lage Grupo e subsidiárias *Milaneza*, *Nacional* e *Harmonia* para Cerealis SGPS S.A., Cerealis Produtos Alimentares S.A., Cerealis Moagens S.A., Cerealis Internacional S.A.. A “Cerealis Produtos Alimentares” é responsável pela produção e comercialização de produtos alimentares para o consumidor como massas, bolachas, cereais de pequeno-almoço, farinhas e produtos refrigerados, a “Cerealis Moagens” pela produção e comercialização de trigo e farinha de centeio, e a “Cerealis Internacional” pelo comércio de grãos de compra para processamento em empresas do grupo e para a exportação de seus produtos (Figura 1.1). A missão, apoiada por pessoas competentes e motivadas, é o desenvolvimento de produtos derivados da transformação de cereais, com base no bem-fazer e se concentrar nos negócios de todos os produtos fabricados e comercializados pela empresa. Com 96 anos, a Cerealis cresce com uma forma sustentada em todas as áreas de atividade: massas, farinha, bolachas, cereais de pequeno-almoço e produtos refrigerados. Com presença nos 5 continentes, os produtos Cerealis são a preferência de milhões de consumidores, e um dos mais importantes grupos agroalimentares portugueses (Cerealis 2016).

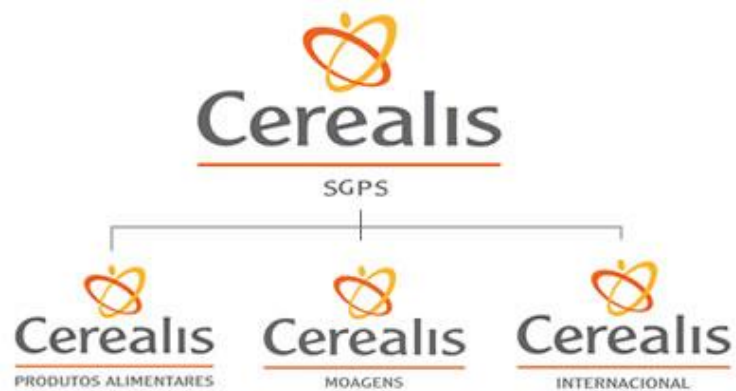


Figura 1.1: Organização do grupo Cerealis; adaptado de (Cerealis 2016)

1.2 Toxicidade e Exposição à Acrilamida

A utilização do calor para cozinhar os alimentos despoletou uma importante revolução na alimentação humana. Atualmente sabe-se que durante a confeção de alimentos a altas temperaturas ocorrem diversas reações químicas. Diversos compostos tóxicos resultam de uma dessas reações – reação de *Maillard* – que ocorre entre grupos carbonilo de açúcares e grupos amina de proteínas. Desta reação resultam também o acastanhamento do alimento e a melhoria de algumas propriedades organoléticas (Hellenäs *et al.* 2005).

A acrilamida, 2-propenamida, de fórmula química $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$, é uma molécula de baixa massa molecular (71,08 g/mol), solúvel em água e de aspeto cristalino à temperatura ambiente, que resulta da Reação de *Maillard* (Figura 1.2) (Elmore *et al.* 2015). Polimeriza quando aquecida até ao seu ponto de fusão e com radiação ultravioleta. O ponto de fusão é de 84,5°C e a pressão de vapor é de 0,9 Pa a 25°C. A solubilidade a 30 ° C é elevada em água (2 a 155 g / L), metanol (1550 g / L), etanol (862 g / L), e acetona (631 g / L). É menos solúvel em clorofórmio (26,6 g / L) e benzeno (3,46 g / L) (WHO 1999). Como composto químico industrial é utilizado para produção de poliacrilamidas, usadas em tratamentos de água, produção de colas, papel e cosméticos (EFSA 2015).

Em 1997, durante a construção de um túnel rodoviário na Suécia, foi incorporada acrilamida numa mistura líquida. Contudo, após a ocorrência de infiltrações de água, foi observado que a acrilamida que não havia solidificado misturou-se com a água acabando por confluir num rio adjacente, provocando a morte de peixes e a paralisia de vacas que beberam a água contaminada, transformando-se num escândalo social. Perante esta realidade, foram efetuadas análises ao sangue a trabalhadores do túnel, tendo-se encontrado fragmentos de acrilamida ligados à hemoglobina. Surpreendentemente, foram encontrados fragmentos idênticos no sangue dos indivíduos do grupo de controlo que não tinha sido sujeito a exposição ocupacional (Reynolds 2002). Este foi assim o ponto de partida para a descoberta, mais tarde, de que a presença de acrilamida estava relacionada com a alimentação (Reynolds 2002).

A descoberta de acrilamida em alimentos processados a altas temperaturas, foi divulgada pela primeira vez por Tareke *et al.* (2002), e, desde essa data, que a indústria alimentar, os Estados-Membros e a Comissão Europeia, têm desenvolvido esforços consideráveis na investigação das vias de formação da acrilamida e na redução dos teores desta substância nos alimentos transformados.

O teor deste contaminante nos alimentos tem sido monitorizado por 25 países europeus e reportado à Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA 2012), tendo permitido

compilar alguns valores indicativos de acrilamida baseados nos dados de monitorização da EFSA no período 2007-2012. Contudo, atendendo ao ainda enorme desconhecimento sobre o tema, estes valores são apenas indicativos e destinam-se unicamente a servir de “valores de referência”, para assinalar a necessidade de investigação nos alimentos com valores superiores de acrilamida, não representando limiares de segurança.

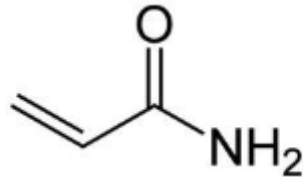


Figura 1.2: Fórmula química da acrilamida

Para além de estar presente em alimentos, a acrilamida é encontrada também no ambiente (devido a descargas industriais), cosméticos, águas para consumo e fumo do tabaco. A exposição humana à AA pode ser por ingestão, inalação ou contacto com a pele (Bergmark 1997). A contaminação do ambiente por acrilamida pode ocorrer como consequência da sua produção ou da produção de poliacrilamidas. Devido à sua elevada solubilidade em água, a acrilamida tem também elevada mobilidade nos solos. A sua biodegradação ocorre no solo em diferentes níveis, dependendo do tipo de solo, pH e temperatura. A hidrólise por enzimas é um dos mecanismos para remover a AA dos solos e água (US-EPA 2007).

A exposição pela dieta é a mais preocupante, já que cerca de 40% dos alimentos contém este composto. Entre 10 a 50% da AA da dieta das mulheres grávidas passa através da placenta e o leite materno também contém este tóxico (Sörgel *et al.* 2003). Nos EUA a maior parte da exposição à acrilamida advém das batatas fritas, pães, cereais, bolachas e outros *snacks* (Friedman 2003). Na Europa, pão torrado, café e batatas são as principais fontes alimentares da AA (EFSA 2015).

A exposição humana à AA poderá ter propriedades toxicológicas (neurotoxicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva), tendo sido classificada no grupo 2^a (provavelmente carcinogénica em humanos) como carcinogénica pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (WHO 1994). A AA possui um grupo carbonilo α,β -insaturado com reatividade eletrofílica, que pode reagir com grupos nucleófilos de

moléculas biológicas, e contribuir para efeitos tóxicos. A reação da AA com proteínas é extensa e os produtos desta reação são utilizados como biomarcadores da sua presença (EFSA 2015). Após entrar no sistema circulatório, é rapidamente distribuída nos tecidos, atravessa a placenta e é transferida para o leite materno. É metabolizada em conjunto com a glutathione (GSH) e também por epoxidação, originando a glicidamida (GA). A formação de GA é mediada preferencialmente pelo citocromo P450, e está na base da neuro e genotoxicidade da AA. Aductos covalentes de ADN de GA foram observados *in-vitro* e em experiências com animais, sendo utilizados como biomarcadores (Bergmark 1997, EFSA 2015).

Em 2002, a FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) recolheram as opiniões científicas sobre a implicação da acrilamida presente em alimentos na saúde humana, e as necessidades de investigação iminentes. Concluiu-se também que a alimentação tem uma contribuição significativa na exposição à AA e que a sua média para a população geral foi entre 0,3 e 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c./dia. Já também se previa que as crianças tinham uma ingestão duas ou três vezes superior aos adultos (FAO/WHO 2002).

Em 2005 a FAO/WHO e o Comité Especialista em Aditivos Alimentares (JECFA) apresentou os dados atualizados acerca da exposição à AA. A ingestão pela dieta do composto seria entre 1 e 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c./dia para a população geral, incluindo crianças, e para consumidores com ingestão mais elevada, respetivamente. Os estudos realizados até à data não foram considerados conclusivos para estabelecer uma relação dose-resposta pela JECFA (FAO/WHO 2005).

A Agência Alimentar Francesa (AFSSA 2003) publicou uma primeira estimativa de exposição à AA da população francesa em diferentes grupos etários. Para adultos, os valores situavam-se entre 0,5 e 0,98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia para a média e consumos mais elevados, respetivamente (AFSSA 2003). Em 2012, a mesma Agência (entretanto denominada ANSES) publicou novas atualizações da exposição à AA. A acrilamida foi analisada em 192 amostras de alimentos. As maiores concentrações estavam presentes nas batatas fritas (724 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e bolachas salgadas (697 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A média da exposição foi de 0,43 \pm 0,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia para adultos e 0,69 \pm 0,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia para crianças (ANSES 2015). Os resultados para a exposição foram inferiores aos iniciais, no entanto os limites de referência para efeitos carcinogénicos situam-se abaixo do percentil 95 de exposição, o que é uma razão de preocupação para a Agência (Sirot *et al.* 2012).

Existe somente o limite legal de acrilamida para a água, já estabelecido para o valor de 0,1 µg/L na Diretiva 98/83/EC (NFC 1998). Uma grande percentagem de alimentos contém esta molécula, pelo que é imperativo legislar os seus limites.

Entre 2007 e 2011 foram estudados os níveis de AA em produtos alimentares dos Estados Membros da União Europeia. Com base nos resultados, a Comissão Europeia delineou valores indicativos para a acrilamida em diferentes tipos de alimentos (UE 2013). Estes valores não são “valores de segurança”, mas sim “valores de referência”, para que seja promovida uma maior investigação nos alimentos com valores superiores de AA, e consequente redução da sua formação (EFSA 2015) – Tabela 1.1. Neste documento, o Painel Científico para os Contaminantes na cadeia alimentar (painel CONTAM) retrata a toxicidade e a exposição à AA através da alimentação. Em 2013 a Comissão Europeia adotou uma recomendação para a investigação de acrilamida em alimentos (UE 2013). A FDE, as indústrias alimentares e as autoridades nacionais da União Europeia trabalharam em conjunto durante mais de 8 anos, e desenvolveram conjuntamente uma *toolbox* para a redução dos teores de AA em vários tipos de alimentos, em casa e na indústria alimentar (FDE 2011).

Também o “Heatox project”, apoiado pela Comissão Europeia, teve como objetivo identificar os riscos para a saúde resultantes da ingestão de substâncias tóxicas, como a acrilamida, presentes em alimentos tratados termicamente e ricos em hidratos de carbono. O estudo começou em 2003 e explorou o impacto das matérias-primas, da confeção e do processamento dos alimentos na indústria alimentar, restaurantes, hotéis e casas. Como resultado elaborou-se recomendações de modo a minimizar o impacto destas substâncias tóxicas na saúde (Hellenäs *et al.* 2005).

Em Portugal, foi estimada a ingestão de acrilamida com base nos níveis desta em alimentos portugueses rastreados, e no projeto Epiporto. As médias de acrilamida em alimentos situam-se entre 13 e 810 µg/kg, sendo a mais elevada em batatas fritas e substitutos de café. A média de ingestão para adultos residentes no Porto foi de 41,5 µg/kg, 0,6 e 0,7 µg/kg de p.c./dia para mulheres e homens, respetivamente. As maiores fontes de acrilamida foram batatas fritas (36%), carne (25%) e pão (12%). As escolhas dentro de cada tipo de alimentos resultam em variações na exposição à AA de 4% para batatas fritas e 14% para café e derivados (Soares 2015).

Tabela 1.1: Valores indicativos de Acrilamida para diferentes produtos alimentares (adaptado de UE 2013)

Género alimentício	Valor indicativo (µg/kg)
Batatas fritas prontas a comer	600
Pão fresco	
a) À base de trigo	80
b) Excluindo pão à base de trigo	150
Cereais de pequeno-almoço (exceto papas de aveia)	
— produtos à base de farelo e cereais integrais, grãos tufados pelo processo de <i>gunpuffing</i> (neste último caso, apenas quando tal constar do rótulo)	400
— produtos à base de trigo e de centeio (*)	300
— produtos à base de milho, aveia, espelta, cevada e arroz (*)	200
Bolachas e <i>wafers</i>	500
Bolachas salgadas (<i>crackers</i>) com exceção de <i>crackers</i> à base de batata	500
Pão denominado <i>knäckebrot</i>	450
Pão-de-espécie (<i>gingerbread</i>)	1000
Produtos semelhantes aos outros produtos desta categoria	500
Café torrado	450
Café instantâneo (solúvel)	900
Bolachas e tostas para lactentes e crianças jovens	200
Alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças jovens	50
(***), exceto bolachas e tostas	
(*) Cereais não integrais e/ou não à base de farelo. O cereal presente em maior quantidade determina a categoria. (**) Tal como definidos no artigo 1.º O, n.º 2, alínea b), da Diretiva 2006/125/CE da Comissão, de 5 de dezembro de 2006, relativa aos alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens (JO L 339 de 6.12.2006, p. 16). (***) Tal como definidos no artigo 1.º O, n.º 2, alínea a), da Diretiva 2006/125/CE.	

Em Friedman (2003), e Park *et al.* (2005) foi administrada água contaminada com AA a ratos F344. Em ambos os estudos o risco de incidência de tumores aumentou 10%. No entanto, embora as vias de metabolismo de AA sejam semelhantes em ratos e seres humanos, existem diferenças quantitativas, tais como a extensão da bioativação de AA a GA ou desintoxicação de GA, que podem resultar em diferenças de espécies na sensibilidade (FAO/WHO 2002). O nível sem efeito observável (NOEL) para indução de alterações morfológicas nos nervos observados num estudo de 90 dias em ratos, foi de 0,2 mg/kg de p.c./dia, enquanto o NOEL geral para efeitos reprodutivos e de desenvolvimento e outras lesões não-neoplásicas foi superior (2 mg / kg de p.c. por dia) (Bjellaas *et al.* 2007). De entre os efeitos adversos com ingestões orais superiores a 0,107 mg/kg em roedores, observou-se

perda de peso, efeitos neurológicos como paralisia dos membros posteriores e alterações histopatológicas em nervos periféricos (EFSA 2015). Nos ratos verificou-se também degeneração do epitélio dos espermatídios e espermatócitos, redução de espermatozoides, inflamação da glândula prepucial, e hiperplasia do epitélio pulmonar alveolar. Nas fêmeas houve também desenvolvimento de quistos nos ovários. Observou-se também, para além da neurotoxicidade, outros efeitos nefastos como atrofia do músculo-esquelético, atrofia testicular, hiperplasia da medula óssea e degeneração e necrose do fígado. Não foram observados efeitos adversos nestes estudos com roedores em exposições de aproximadamente 2mg/kg p.c./dia. Em *Zenick* (1986) foram administradas a ratos de laboratório doses de 1, 10 e 100 mg/kg p.c./dia de AA, demonstrando-se posteriormente que a AA é completamente absorvida, rápida e uniformemente distribuída pelos órgãos e tecidos. Outros estudos toxicológicos têm sido realizados em animais evidenciando a toxicidade reprodutiva e o *stress* oxidativo (Katen *et al.* 2016) com a exposição à AA (Jin *et al.* 2016).

Em humanos, existem alguns estudos do impacto da AA isoladamente, mas nenhum foi conclusivo. São necessários estudos a longo prazo para determinar o risco na saúde humana (EFSA 2015). Em NHANES 2003-04 foram analisados aductos de hemoglobina e acrilamida (AA-Hb) e glicidamida (Gly-Hb) em 7000 participantes. Durante mais de três anos foram realizados questionários de 24 horas anteriores, questionários de frequência alimentar, estilo de vida e dados sociodemográficos e antropométricos. Os questionários 24 horas foram combinados com concentrações de AA em alimentos. A ingestão de acrilamida foi correlacionada positivamente com os aductos AA-Hb e Gly-Hb (Tran *et al.* 2010).

1.3 Formação em alimentos

Em 2002 teve início a preocupação com este composto orgânico quando se descobriu que a AA também se forma em alimentos que atingem temperaturas acima dos 120° (Tareke *et al.* 2002, Alexander 2006). Esta formação é feita em conjunto com reações de *Maillard* entre determinados aminoácidos, como a asparagina, e açúcares redutores (WHO 2002, Yaylayan *et al.* 2005). Alimentos com elevado teor em hidratos de carbono, como batatas fritas, pães, bolachas, café e misturas de cereais, são mais suscetíveis à formação da AA. O calor é necessário para iniciar a reação de *Maillard*, que é conhecida como “escurecimento não enzimático” e é responsável pela cor acastanhada nos alimentos e formação de uma multiplicidade de compostos de aroma característicos formados durante o processamento de alimentos de pão, carne, café, nozes e outros a temperaturas mais altas (Friedman 2003).

A formação da acrilamida através da reação de *Maillard* entre o aminoácido asparagina, e açúcares redutores parece ser a maior via de formação de acrilamida (Tareke *et al.* 2002, Mottram *et al.* 2002, Xu *et al.* 2014). Nesta ocorre a descarboxilação e a remoção do grupo amina da asparagina, com a presença de um grupo carboxilo de um açúcar redutor e calor (Yaylayan 2005, Xu *et al.* 2014). O tipo de açúcares presente também influencia a formação de AA: açúcares como a frutose ou a glucose parecem ser mais reativos que outros (Arvanitoyannis *et al.* 2014), pois o grupo α -hidroxilo-carbonilo é mais reativo que o grupo di-hidroxilo-carbonilo a converter a asparagina em acrilamida.

Também existem outras vias de formação da acrilamida que não necessitam da asparagina, como através da acroleína e ácido acrílico em alimentos ricos em gordura (Ehling *et al.* 2005). Compostos resultantes da reação de *Maillard* também estão correlacionados com a formação de AA – Figura 1.3. Na Figura 1.4 e Tabela 1.2 estão representadas as principais fontes alimentares de acrilamida em alimentos e a média da sua concentração em alguns alimentos, respetivamente.

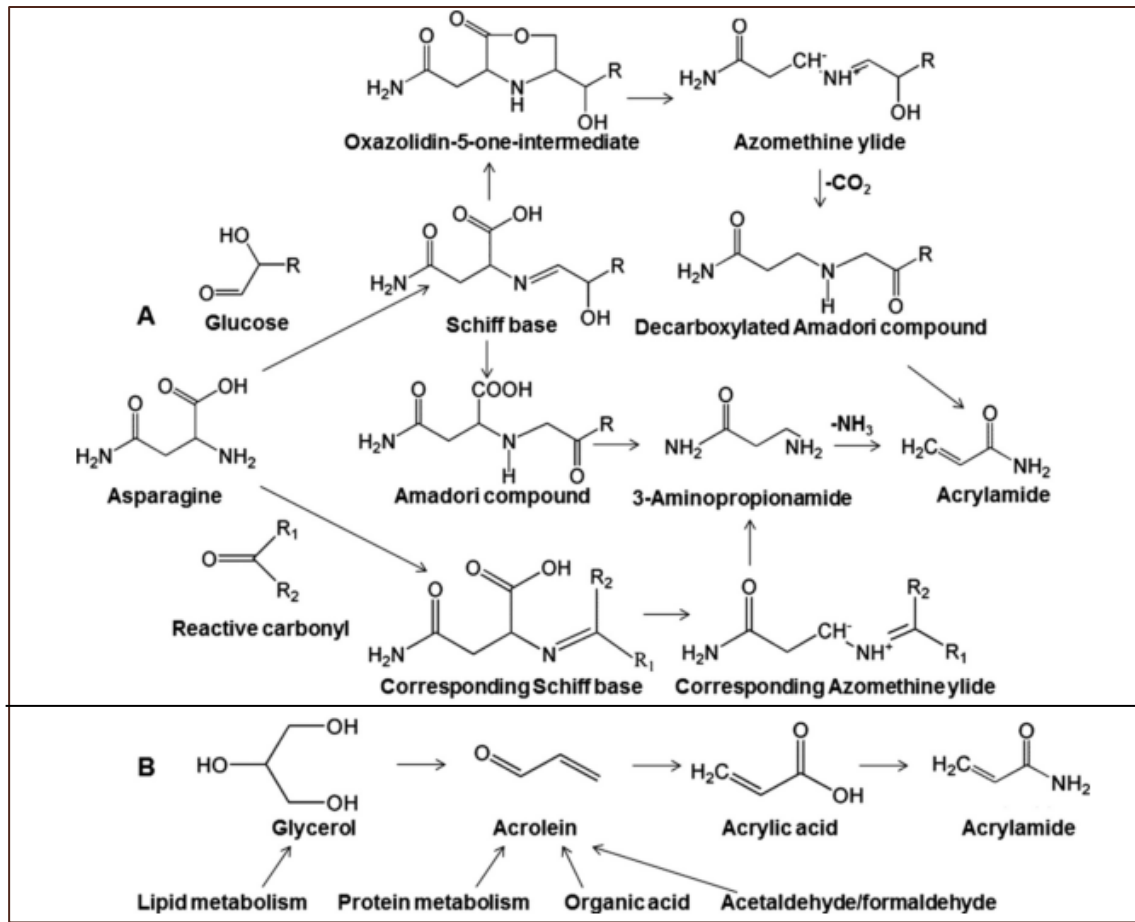


Figura 1.3: Vias de formação de acrilamida (A) via da asparagina (B) via lipídica (Xu 2014)

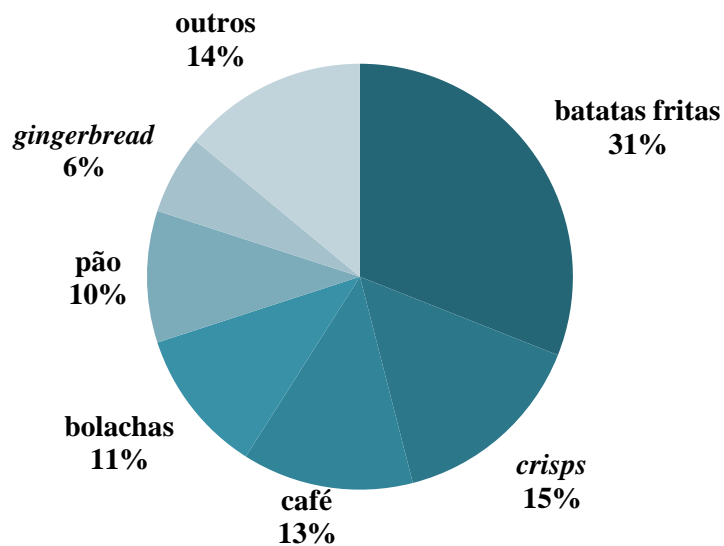


Figura 1.4: Contribuição dos grupos alimentares (%) para a exposição à AA na população Holandesa (Polly et al. 2005).

Tabela 1.2 Concentração de AA em alguns grupos alimentares; n: número de amostras; adaptado de EFSA (2015)

Categoria Alimentar	n	Média (µg/kg)
Cereais de pequeno-almoço	1230	161
Bolachas	2065	265
Café	1457	522
Outros produtos com base em batatas, cereais e cacau	568	97

1.4 Produção industrial de bolachas e caracterização do processo

As bolachas são um dos produtos alimentares mais vendidos do mundo por diversas razões: a sua elevada validade, a sua grande conveniência, a propensão do ser humano para gostar dos seus ingredientes como açúcar ou chocolate, e o seu relativo baixo preço. Os ingredientes base das bolachas são farinha (maioritariamente de trigo), açúcar e gordura (vegetal). O uso de cacaos e aromas é também antigo e permitiu melhorar as formulações. Atualmente há uma tendência para o uso de ingredientes mais naturais como substitutos de aditivos artificiais. A ciência, investigação e inovação são essenciais para compreender e a tecnologia inerente à produção de bolachas e aumentar a competitividade (Manley 2000).

O processo de fabrico das bolachas resulta da mistura de diversos ingredientes em amassadeiras, onde são hidratados e trabalhados até se obter as características reológicas necessárias para serem moldadas. Podem-se classificar três tipos de massa: a massa “dura”, caracterizada por menores quantidades de gordura e açúcar, que dá origem a bolachas tipo “Maria” ou “Água e Sal”; a massa “mole” ou “soft” caracterizada por elevadas quantidades de gordura e açúcar, que dá origem a bolachas tipo “Cookie” ou “Digestiva”. Após a mistura dos ingredientes e formação da massa, as bolachas são moldadas por uma das tecnologias: laminador com molde de corte. À moldagem das bolachas segue-se a cozedura, em forno com tapete contínuo, a temperaturas e tempos de cozedura que variam com o tipo de bolacha. Após a cozedura, as bolachas são arrefecidas (com ou sem secador) e posteriormente embaladas em películas de plástico e/ou cartão. Na Figura 1.3 encontra-se representado o esquema de produção industrial de bolachas. Nas Tabelas 1.3 e 1.4 estão indicados os parâmetros de temperaturas, tempos e teores de humidades antes e após as cozeduras das bolachas. Na

Tabela 1.5 estão indicadas as matérias-primas e validades das bolachas analisadas. As quatro referências diferentes de bolachas analisadas neste trabalho estão representadas pelas letras A, B, C e D.

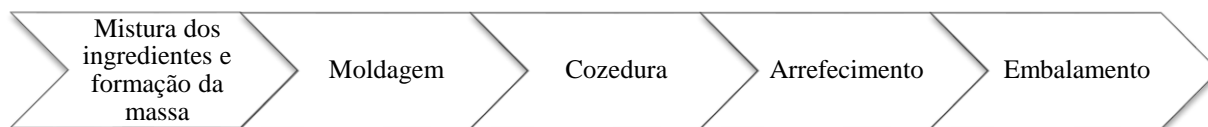


Figura 1.5: Esquema das etapas da produção industrial de bolachas

Tabela 1.3: Temperaturas e tempos de cozedura do forno de cozedura das bolachas a) parâmetro b) no momento de recolha da amostra

Bolacha	1ª zona do forno (°C)	2ª zona do forno (°C)	3ª zona do forno (°C)	Tempo de cozedura (min.)
A	150 +-10	240 +-10	240 +-10	5,5
B	200 +-10	240 +-10	200 +-10	7
C	150 +-10	240 +-10	240 +-10	5,5
D	180 +-10	240 +-10	230 +-10	7

Tabela 1.4: Teores de humidade das bolachas

Bolacha	Pré-cozedura (%) (%) (teórico)	Pós –cozedura (%) (limite mínimo)	Pós-cozedura (%) (limite máximo)
A	20,17	0,4	1,4
B	25,02	1,5	2,5
C	21,09	0,4	1,4
D	25,16	1	2

Tabela 1.5: Matérias-primas das bolachas analisadas

Bolacha	Matérias-primas	Validade
A	farinha de trigo tipo T65 açúcar gordura xarope de glucose-frutose bicarbonato de sódio bicarbonato de amónio	12 meses
B	farinha de trigo tipo T65 gordura xarope de glucose-frutose bicarbonato de sódio bicarbonato de amónio	12 meses
C	farinha de trigo tipo 65 açúcar gordura cacau em pó bicarbonato de sódio bicarbonato de amónio	12 meses
D	farinha de trigo tipo 65 gordura vegetal xarope de glucose-frutose sêmea de trigo (farelo) bicarbonato de sódio bicarbonato de amónio	12 meses

1.5 Fatores que influenciam a formação de acrilamida em bolachas

O nível de asparagina livre em cereais parece ser a maior via de formação da acrilamida (Yaylayan et al. 2005). A escolha de variedades de cereais com menores teores de asparagina livre é aconselhada, mas difícil, dada a influência das condições ambientais na sua produção. Plantas em solos menos ricos em enxofre tendem a ser mais ricos em asparagina, pelo que os produtores devem controlar o nível deste mineral. A fertilização com azoto e as infeções por fungos estão também associados a níveis mais elevados de asparagina nos cereais. Produtos à base de milho e arroz tendem a ter menores teores de acrilamida do que os à base de trigo, cevada, aveia ou centeio. Produtos com farinhas integrais têm maiores níveis de acrilamida (FDA 2016). A escolha de variedades diferentes de cereais é também um determinante no desenvolvimento de AA: cinco variedades de centeio com fertilizações diferentes foram utilizadas para estudar o efeito do azoto e enxofre na formação da AA, onde foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração de asparagina nos grãos e os níveis mais elevados de azoto usados e a concentração final de AA (Postles et al. 2013). Em Przygodzka *et al.* (2015) foi investigada a influência dos tipos de cereais em pães, concluindo que os pães de centeio formam mais AA na cozedura, seguidos pelos pães de trigo espelta e pelos pães de farinha refinada – “pão branco”. No mesmo estudo foram comparadas as taxas de extração da farinha com a formação da AA: farinhas 100% integrais obtiveram concentrações superiores de AA, seguidas das farinhas com extrações de 70%, o que indica que as “farinhas integrais” têm mais precursores da AA. Também as condições de cozedura foram analisadas no mesmo estudo: cozeduras de 30 min. a 240°C obtiveram pães com mais AA do que cozeduras dos mesmos pães a 200°C durante 35 min., o que indica que cozeduras mais longas a menores temperaturas impulsionam menores concentrações de AA. Em todas as variáveis analisadas, as crostas dos pães tiveram níveis mais elevados de AA do que o interior (“miolo”) dos pães (Przygodzka et al. 2015). Já existem várias técnicas de mitigação da acrilamida que envolvem a utilização da enzima asparaginase, que converte a asparagina em ácido aspártico, embora seja necessário controlo dos potenciais efeitos adversos nas propriedades organoléticas dos produtos finais (Xu et al. 2016).

Em batatas fritas a formação de acrilamida está diretamente relacionada com o teor de açúcares livres (Elmore et al. 2015). Nguyen *et al.* (2016) investigaram recentemente os tipos de açúcar como fatores de influência na formação de acrilamida durante a produção de bolachas. Foram comparados os teores de acrilamida em bolachas com glucose, frutose,

sacarose e “glucose+frutose”. A concentração de acrilamida foi superior em bolachas produzidas com frutose comparativamente com as produzidas com glucose. Neste estudo realçam também a importância do aminoácido asparagina presente nos cereais como fator de formação da AA, para além da existência de açúcares redutores. Também Mustatea *et al.* (2015) compararam a influência do açúcar e seus substitutos no desenvolvimento de AA. Foi demonstrado que bolachas adoçadas com açúcar obtiveram concentrações menores de AA, comparativamente com bolachas adoçadas com glucose, mel e frutose. As bolachas adoçadas com frutose foram as que obtiveram maior teor de acrilamida (Mustatea et al. 2015).

Pedreschi *et al.* (2006) compararam a cor de batatas fritas com o teor de acrilamida, e concluíram que esta estava diretamente relacionada com o teor de acrilamida. A componente de cor *L* (luminosidade) estava inversamente correlacionada com a AA e a componente de cor *a* (vermelho) aumentava com o aumento da AA. Outros estudos associaram a cor ao teor de acrilamida em pães (Mustafa et al. 2005) e em bolachas (Gökmen et al. 2008), correlacionando o escurecimento com o aumento da concentração deste.

Os agentes levedantes usados no processo de fabrico de bolachas são outro fator influenciador da formação de acrilamida. O bicarbonato de amónio está relacionado com o aumento da formação de AA, o que não acontece com o bicarbonato de sódio, usado também como levedante na produção de bolachas (Gökmen et al. 2008, Van Der Fels-Klerx et al. 2014). Por outro lado, a adição de pequenas quantidades de cloreto de sódio pode ser um agente redutor de acrilamida em matrizes alimentares (Kolek et al. 2006, Van Der Fels-Klerx et al. 2014).

Ingredientes com pré-tratamento térmico, como cacau ou amêndoas torradas contribuem para o aumento dos teores de AA em produtos finais (Delatour et al. 2004). É aconselhado analisar isoladamente estes ingredientes e verificar a sua contribuição no valor total de AA (FDA 2016). O subproduto e o pH alcalino podem também aumentar os níveis de acrilamida. A AA pode também formar-se a temperaturas inferiores a 100°C, como demonstraram Becalski *et al.* 2011. São necessários estudos do impacto da reincorporação de subproduto durante o fabrico (Rydberg 2003).

O armazenamento dos produtos alimentares após embalagem pode variar o teor em AA. A acrilamida é estável em soluções aquosas mas o mesmo não acontece em alimentos secos

(Adams et al. 2010). Em batatas fritas há o aumento de açúcares redutores ao longo do tempo de prateleira, particularmente em condições de baixas temperaturas (batatas fritas congeladas) (Rak et al. 2013). No entanto, Elmore *et al.* (2015) não demonstraram uma redução significativa de acrilamida em batatas fritas entre dois e seis meses de armazenamento. Alguns estudos indicaram a redução da acrilamida em alguns alimentos durante o seu tempo de prateleira (Delatour et al. 2004, Hoenicke et al. 2005). Contudo, no grupo alimentar das bolachas, apenas em “bolachas dietéticas” é que foi estudada essa evolução, não havendo nenhuma alteração no teor de acrilamida ao longo dos meses. Em Delatour *et al.* (2004) não houve alteração da AA em cereais de pequeno-almoço durante 12 meses.

Na Figura 1.6 estão representados alguns valores de concentrações de acrilamida para diferentes referências de bolachas.

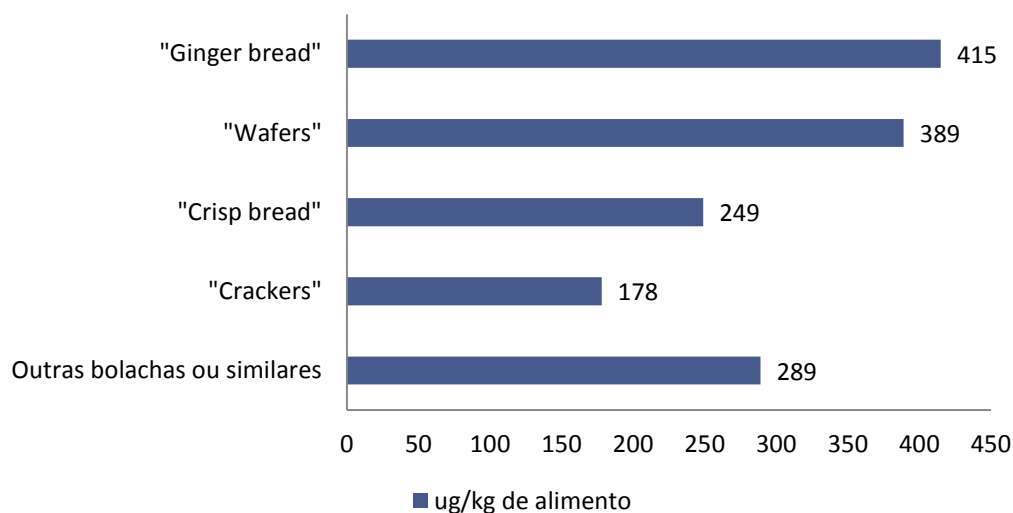


Fig. 1.6: Teor médio de acrilamida em diferentes tipos de bolachas; adaptado de (EFSA 2012)

1.6 Métodos de deteção e quantificação da acrilamida em bolachas

Existem alguns fatores que tornam a acrilamida numa molécula de difícil deteção e quantificação: trata-se de uma molécula de baixa massa molecular, com elevada polaridade e reatividade, logo extremamente difícil de extrair de matrizes aquosas por solventes orgânicos convencionais (EFSA 2015). Alguns estudos têm-se debruçado sobre os métodos analíticos para a quantificação de AA em alimentos (Wenzl et al. 2003, Stadler et al. 2004). A escolha das condições de extração e limpeza ideias depende da matriz alimentar que se está a analisar,

pelo que é necessária a otimização da metodologia. O aumento do volume/expansão das matrizes melhora a extração com os solventes e as taxas de recuperação (Maurus et al. 2003, Wenzl et al. 2003). Outra forma de melhorar a extração é aquecer o solvente ou colocar a matriz em banho de ultrassons (Albishri et al. 2014). Dependendo do teor de gordura, amostras de alimentos pode exigir um passo de desengorduramento no procedimento de limpeza. A limpeza das matrizes pode ser feita pelos métodos de limpeza clássicos, como SPE, mas outros procedimentos, tais como métodos de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) tornam-se cada vez mais populares, por exigirem menos reagentes químicos e permitirem uma separação mais rápida (Oracz et al. 2011).

A acrilamida é detetada com recurso a técnicas cromatográficas, tanto de cromatografia líquida, como de cromatografia gasosa (Hu et al. 2015), sendo a principal diferença o facto da primeira permitir facilmente a análise direta da substância, enquanto a segunda implica, geralmente, uma derivação prévia do composto. Adicionalmente, pela complexidade das matrizes analisadas e pelos elevados níveis de sensibilidade exigidos, ambas utilizam detetores de massa (MS – *Mass Spectrometry*), espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) ou por monitorização iónica selecionada (SIM) (Arvanitoyannis and Dionisopoulou 2014). Como alternativa de baixo custo para a determinação de AA em vários produtos alimentares, a aplicação de HPLC acoplado a um detetor de díodos (HPLC-DAD) foi descrita por Michalak *et al.* em 2013. Outros métodos de análise já foram testados, como o de fluorescência de Liu *et al.* (2014), ELISA, Biossensores Eletroquímicos (Hu et al. 2015) ou GC com detetor por ionização de chama (Seródio 2015). Nos últimos anos, diversos métodos foram publicados para a determinação de AA baseado na eletroforese (Oracz et al. 2011).

A separação por HPLC é realizada principalmente em colunas de fase inversa ou por cromatografia de permuta iónica e a identificação e quantificação de preferência, no modo de MS/MS. Nos últimos anos, o uso de cromatografia líquida de ultra-*performance* (UPLC) tornou-se mais popular devido à elevada sensibilidade e seletividade, sem a necessidade de derivatização. Métodos de HPLC-MS/MS e UPLC-MS/MS têm hoje em dia tornar-se os métodos de escolha para a determinação de AA em produtos alimentares. A determinação de AA nos alimentos por métodos de GC-MS pode ser feita com ou sem derivatização. A vantagem dos processos de derivatização é o aumento da volatilidade e uma seletividade melhorada (EFSA 2015). No modo de ionização de eletrões (EI), os principais iões do fragmento para a identificação e quantificação são m/z 71 e 55, respetivamente. Um aumento na seletividade e diminuição de sinais de interferência é possível pelo uso de CG acoplada a

espectrometria de massa em *tandem* (GC-MS/MS), alcançando-se LOD's no intervalo de 1-5 ug/kg (EFSA 2015).

Isótopos rotulados padrões de AA estão prontamente disponíveis comercialmente, quer como AA-D3, D5-AA, AA-¹³C1 ou como ¹³C3-AA. A adição destes padrões internos no início da análise baseada MS pode melhorar a precisão do resultado como perdas da AA analito nativo durante o tratamento da amostra, que são corrigidas através da utilização do padrão isótopo marcado. A abordagem *spiking* é baseada no estabelecimento de equilíbrio nas interações matriz entre o padrão interno e o analito nativo. Enquanto o equilíbrio não é estabelecido, as diferenças no procedimento de extração podem ter uma grande influência sobre as recuperações (Wenzl et al. 2003).

O método utilizado neste trabalho tem como base no método validado da Agência Belga para a Segurança da Cadeia Alimentar, que utiliza o UHPLC-MS/MS, adaptado para LC-MS/MS e otimizado para matrizes de bolachas (AFSCA 2013). A extração e limpeza prévia da amostra para análise são necessárias. A acrilamida é altamente solúvel em água, pelo que a sua extração pode ser feita em água ou água com solvente orgânico. A extração inicia-se com agitação forte, banho ultrassons e centrifugação. Após a extração é adicionado um padrão interno, [D3]-acrilamida, para comparação e controlo de perdas durante o processo. A purificação é a etapa seguinte e tem como objetivo remover compostos que estão presentes na matriz. Esta pode ser feita por SPE – Extração em Fase Sólida – ou adição de agentes químicos (Berthod et al. 2014, Elbashir et al. 2014).

1.7 Objetivos do trabalho

1. Otimização da metodologia analítica para a determinação do teor de acrilamida em bolachas;
2. Análise do teor de acrilamida em quatro referências de bolachas;
3. Discussão dos resultados considerando os parâmetros das bolachas analisados: matérias-primas, tempo e temperatura de cozedura, humidade, cor e posicionamento no tapete de cozedura.

2. Parte Experimental

2.1 Amostragem

Após a moldagem das bolachas, estas são cozidas num forno com 34 metros de comprimento e 120 centímetros de largura. Nos esquemas 2.1 e 2.2 encontra-se representado o forno de cozedura das bolachas e as suas três zonas de recolha e/ou vigia (zonas 1, 2, 3). No esquema 2.2 está representada a recolha de amostras na linha à saída do forno (margem esquerda, centro e margem direita do tapete do forno). Todas as bolachas foram retiradas de uma linha de produção da Cerealis.

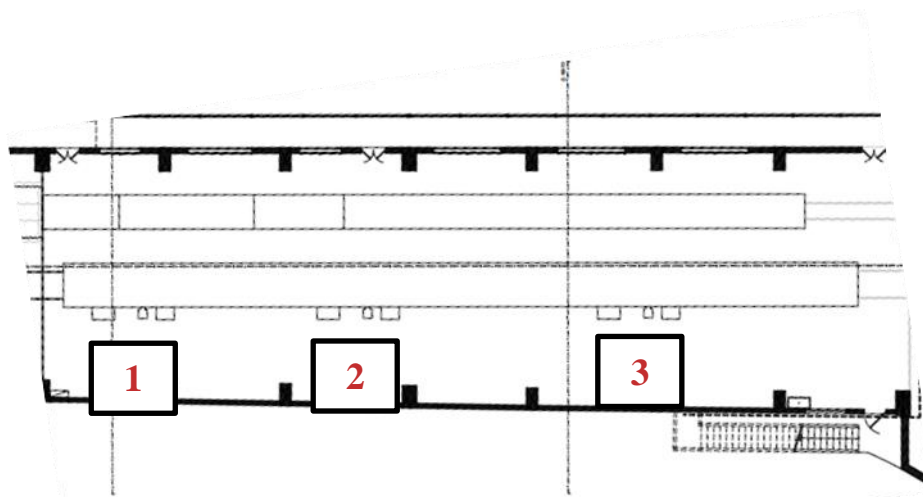


Figura 2.1: Esquema do forno de cozedura e zonas do forno (1, 2 e 3)

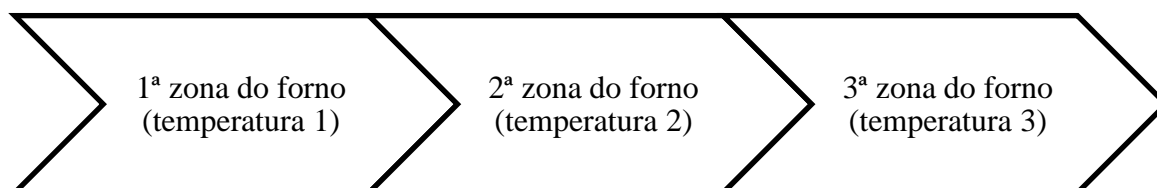


Figura 2.2: Esquema das várias zonas do forno

Para análise do teor de acrilamida foram recolhidas amostras da zona 3 do Forno (“Forno 3”), das margens esquerda e direita do tapete (“Margens”) e do centro do tapete (“Centro”). Na Figura 2.1 está representado o esquema de recolha de amostras no tapete do forno. A

variação da temperatura nas diferentes zonas do tapete justificam a recolha de amostras diferentes. As bolachas do centro do tapete estão sujeitas a temperaturas superiores, e por isso apresentam tonalidades de cor distintas. Os objetivos de serem recolhidas bolachas de diferentes zonas do forno e tapete foram: avaliar a evolução da formação da AA ao longo da cozedura, a diferentes temperaturas e a diferentes exposições do calor o tapete do forno.

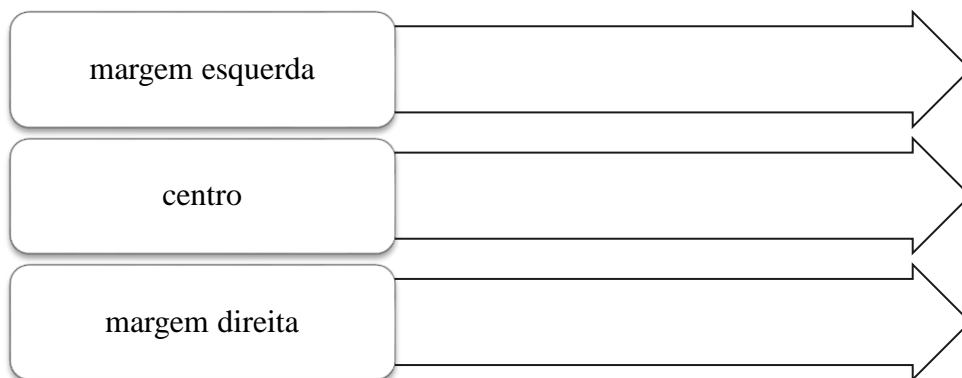


Fig. 2.3: Esquema da recolha de amostras no tapete do forno; as setas indicam o sentido da produção de bolachas

2.2 Análise do teor de humidade

O teor de humidade das bolachas analisadas foi medido em estufa, no dia mesmo da preparação das amostras para extração. Cerca de 5 g de bolacha moída foram pesadas e secas durante 3h a 100°C. Após arrefecimento, foi medida a massa seca da bolacha, e a partir desta, calculado o teor de humidade.

2.3 Análise da cor

A cor das bolachas foi analisada com o colorímetro *Minolta CR-410*. Os parâmetros usados foram a Luminosidade (*L*), Vermelho (*a*) e Amarelo (*b*). As bolachas foram analisadas

na sua forma de consumo (sem serem moídas), para que a cor pudesse ser considerada um método de controlo em futuros testes industriais e parâmetros de qualidade.

2.4 Reagentes

Acrilamida Sigma Aldrich grau de pureza $\geq 95\%$ para HPLC

Acrilamida-d3 Standard solution em acetoneitrilo 500mg/l Sigma Aldrich

Água purificada para HPLC “Millipore Iberian, Spain”

Metanol para UHPLC Panreac

Etanol 99.5% Panreac

Diclorometano para HPLC Panreac

2.5 Solventes

Solvente A: H₂O 0.1% HCOOH (ácido acético)

Solvente B: Metanol para HPLC

2.6 Equipamentos e Material

Tubos de *Falcon* de 50ml

Picadora “Electronia”

Peneiro “Endcotts for accuracy, test sieve” Mash N°35 (500 μ m ASTM)

Balança electrónica “Kern” ABJ 220-4M

Banho Ultrasons “Cole-Parner” 8891

Agitador “Yellowline” RS10

Centrifugadora “Hermle” Z300K

Estufa “Ehret” TK4032

Colunas SPE HLB Oasis 200mg, 5 ml

Colunas SPE Bond ELut – Accucat 200mg, 3ml

HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha) *Electrospray Orbitrap*

2.7 Soluções

Tabela 2.5 Preparação das soluções padrão de acrilamida

Solução	Concentração	Diluição
SS (solução <i>stock</i>)	1 mg/ ml	20 mg/20 ml etanol
SFA (solução filha A)	5 µg/ ml	100 µg SS/ 20 ml água
SFB (solução filha B)	0.5 µg/ ml	1000 µl SFA/ 10 ml água
SFC (solução filha C)	0.05 µg/ ml	100 µl SFA/ 10 ml água

Tabela 2.6 Preparação das soluções padrão de acrilamida deuterada (padrão interno)

Solução	Concentração	Diluição
SIS (solução <i>stock</i>)	500 g/ ml	-
SIA (solução filha A)	10 µg/ ml	200 µg SIS/ 10 ml água
SIB (solução filha B)	0.5 µg/ ml	1000 µl SIA/ 20 ml água

Tabela 2.7 Preparação das soluções de calibração

Nível de calibração	Solução de acrilamida (µl)		Solução de acrilamida-d3 SIB (µl)	Água purificada (µl)	Concentração final (ng/ml)
1	100	SFC	500	400	5
2	200	SFB	500	300	10
3	200	SFA	500	300	100
4	50	SFA	500	450	250
5	100	SFA	500	400	500

A reta de calibração foi delineada através das áreas dos picos das soluções-padrão e da fórmula:

$$Y = \frac{\text{Área de AA} \times \text{Área de AA[d3]}}{\text{Área de AA[d3]}}$$

2.8 Preparação dos extratos de bolacha

Para preparação dos extratos de bolachas colocou-se aproximadamente 1g de cada bolacha moída na picadora e posteriormente peneirada num tubo de *Falcon*. Adicionou-se 1000µl de padrão interno SIB e seguidamente 15 ml de água ultrapura a cada tubo. Colocou-se em banho ultrassons durante 15 min. Adicionou-se 2 ml de diclorometano a cada tubo e colocou-se 20 min. no agitador. Colocou-se os tubos a centrifugar durante 15 min. a 1500 rpm numa centrifugadora. Retirou-se 1000µl de sobrenadante de cada tubo para extração e purificação por extração em fase sólida (SPE).

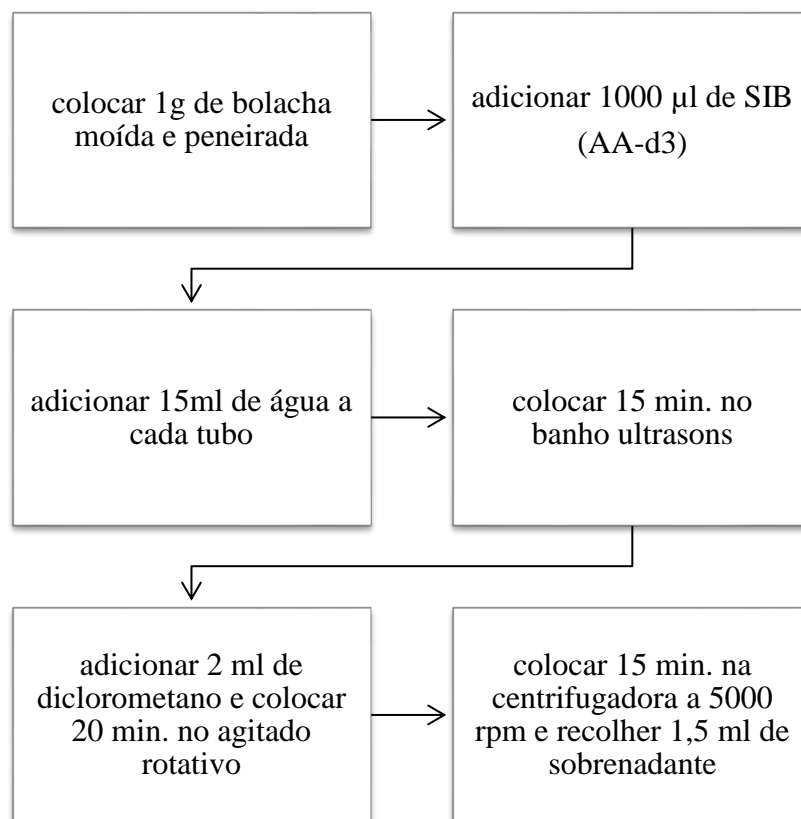


Figura 2.4: Preparação dos extratos de bolacha

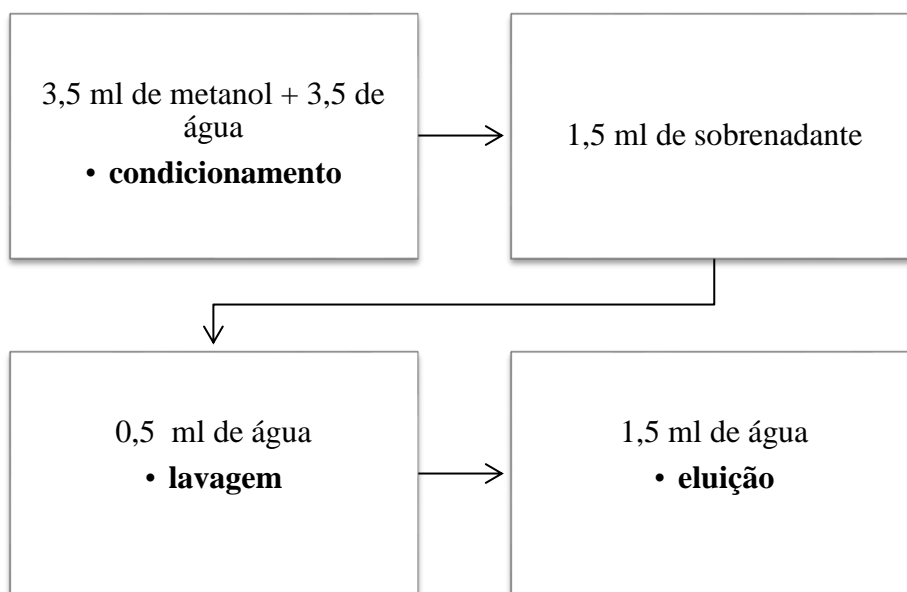


Figura 2.5: Primeira extração em fase sólida (SPE)– HLB Oasis

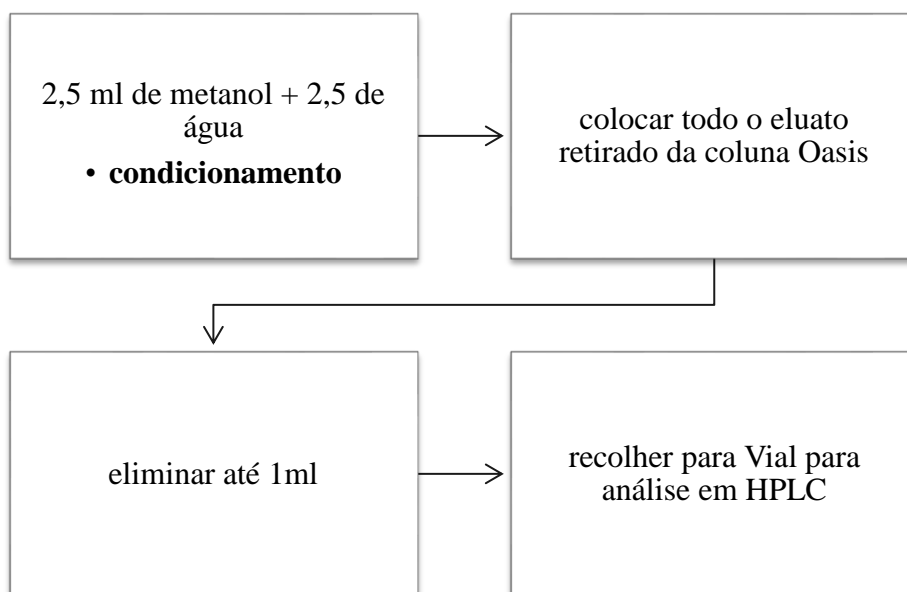


Figura 2.6: Segunda extração em fase sólida (SPE) – Bond Elut

2.9 Condições cromatográficas

As amostras foram separadas em HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha) *Electrospray Orbitrap*, utilizando uma coluna C18 Phenomenex Gemini (Phenomenex, EUA), tamanho de partículas de 3 microns e dimensões 4,6 mm DI x 150 mm. As amostras foram eluídas através de um gradiente de 90% de solvente A (H₂O 0,1% de HCOOH) e 10% de solvente B (MeOH) durante 2 min. a uma taxa de fluxo de 0,4 ml/min, posteriormente durante 18 min. ao longo de 100% de solvente B e 10 min. em gradiente de 10% de solvente B.

A análise foi feita em espectrofotómetro de massa híbrido LTQ XL *Orbitrap*TM (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha), controlado pelo LTQ Tune Mais Xcalibur 2.5.5 e 2.1.0. A voltagem de ionização de electropulverização capilar da fonte (ESI foi ajustada para 3,2 kV. A temperatura capilar foi 300°C. A tensão capilar foi de 2 V e a tensão de tubo de lente de 25 V. Foi realizada uma análise *Full-scan*, SIM (Monotorização de Seleção Iónica) e MS/MS.

2.10 Tratamento estatístico dos resultados

Os dados obtidos foram analisados utilizando métodos de análise estatística multivariável, em particular análise de componentes principais (PCA) e regressão linear múltipla (MLR), de acordo com a estratégia descrita na Figura 2.6. O PCA é essencialmente um método descritivo, e, normalmente, o primeiro passo de exploração de dados, que permite que os aspetos principais da variabilidade de um conjunto de dados sejam visualizados, sem o constrangimento de uma hipótese relativa à relação inicial dentro de amostras e entre as amostras e as respostas (variáveis). Os principais objetivos deste procedimento são encontrar relações entre os parâmetros diferentes (objetos e variáveis) e detetar agrupamentos possíveis dentro de objetos e/ou variáveis. Para encontrar as principais fontes de variabilidade dos dados e a relação entre ou dentro de objetos e variáveis, a matriz inicial [definida como $X(n, m)$] é convertida numa matriz de espaço de objeto (amostras), uma matriz de espaço de variável (dados químicos, neste caso) e uma matriz de erro (que representa a variação não representada pelos componentes principais extraídos). A decomposição é formalizada por:

$$\mathbf{X}_{(n,m)} = \mathbf{T}_{(n,k)}\mathbf{P}_{(k,m)}^T + \mathbf{E}_{(n,m)}$$

em que T é a matriz de pontuação, P é a matriz de cargas, E é a matriz de erro, o símbolo n representa o número de objetos (amostras de bolacha), m é o número de variáveis (neste estudo, os parâmetros de cor, teor de humidade, zonas de amostragem) e K é a número de componentes principais utilizados (Jolliffe 1986).

O objetivo geral da MLR é estudar a relação entre a variável dependente (Y) e as outras variáveis independentes (Vikstrom *et al.* 2012). A função matemática é uma equação de primeiro grau descrita como:

$$Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_m X_m + \varepsilon$$

Onde X_m representa as variáveis experimentais testadas, α é o termo constante, e ε o erro preditivo. O β_m são os coeficientes de regressão das variáveis independentes, e cada um representa o "peso" (correlação) da respetiva variável independente.

O pacote estatístico *StatBox* 7.5 (Grimmer Logiciel, Paris, França) foi utilizado para todos os cálculos estatísticos.

3. Resultados e Discussão

3.1 Reta de calibração

A partir das concentrações de acrilamida obtidas por espectrometria de massa, delineou-se a reta de calibração. Na Tabela 3.1 estão indicadas as concentrações de AA utilizadas para delineação das retas de calibração e as áreas dos picos retiradas após a análise, através do *software* QualBrowser Xcalibur, Thermo Fischer Scientific. Nas Figuras 3.1 e 3.2 estão representados exemplos de cromatogramas do padrão de 100 µg/L de acrilamida e de AA-d3, respetivamente.

Tabela 3.1: Concentrações e áreas dos picos da acrilamida e acrilamida-d3 para delineação da reta de calibração de gama alta

Conc. Acrilamida (µg/L)	Área de Acrilamida	Conc. AA-d3 (µg/L)	Área AA-d3 (IS)	Área AA*Conc.IS Area IS
5	103302,503	250	6490452,284	3,97901789
10	298890,563	250	5946554,237	12,56570407
100	3081844,878	250	6665073,704	115,5968041
250	7877875,385	250	6701676,747	293,8770282

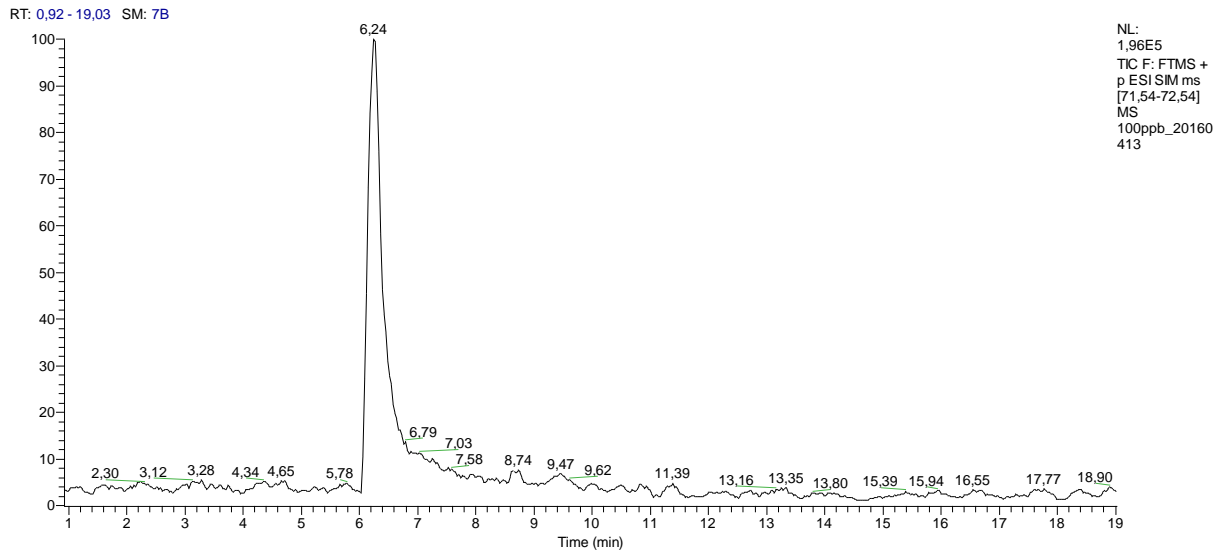


Figura 3.1: Cromatograma da solução de acrilamida 100 ng/ml

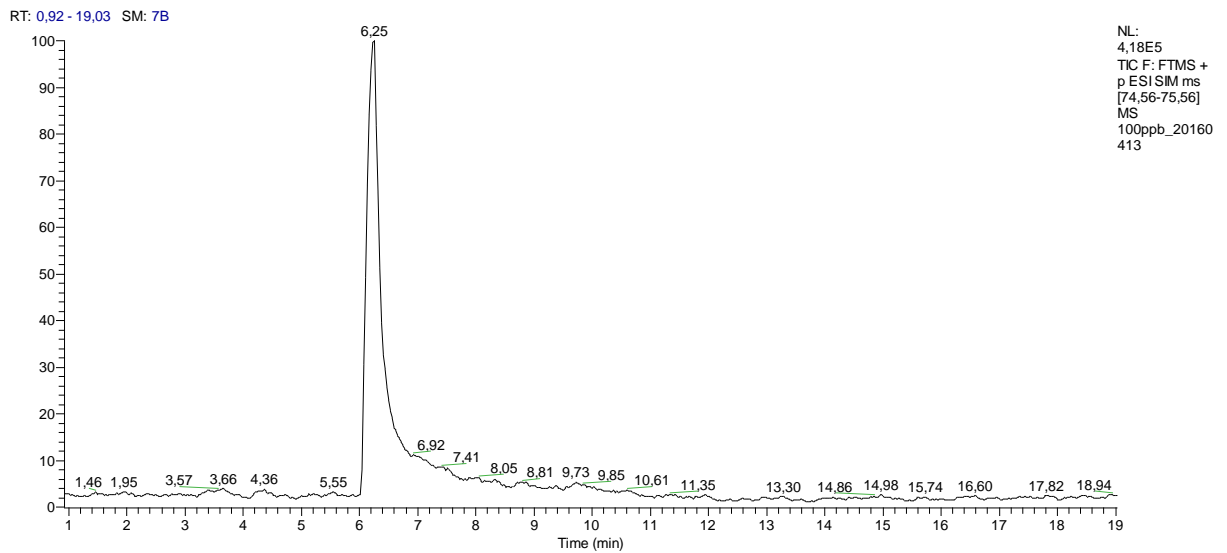


Figura 3.2: Cromatograma da solução de AA-d3 100 ng/ml

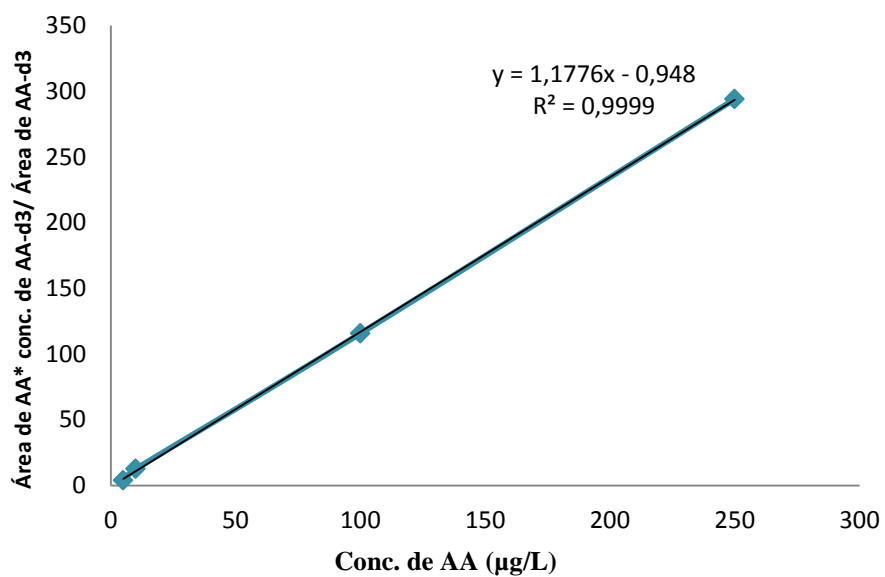


Fig. 3.3: Reta de calibração para diferentes concentrações de AA

Os cromatogramas das soluções-padrão permitiram a delineação de uma curva de calibração com um $R=0,99$, que está representada na Figura 3.3.

3.2 Repetibilidade

Foram realizados oito ensaios de repetibilidade, com o resultado de um desvio-padrão de 33,15 µg/Kg e um coeficiente de variação de 11,13% (Tabela 3.4). Os dados relativos a cada ensaio individual estão representados na Tabela 3.2. Na Figura 3.4 está representado um exemplo de cromatograma de um extrato de bolacha A.

Tabela 3.2: Dados dos ensaios de repetibilidade

Ensaio	Área do pico da AA	Conc. AA-d3 (µg/L)	Área do pico da AA-d3 (IS)	Área do pico da AA*Conc. IS/Área IS	Conc. AA µg/kg bolacha
1	47939,231	33,333	103428,212	15,450	254,09
2	55394,885	33,333	109616,897	16,845	277,30
3	63999,754	33,333	103828,551	20,546	343,88
4	61491,389	33,333	113061,072	18,129	309,85
5	64725,462	33,333	131332,358	16,428	269,83
6	78604,440	33,333	121908,328	21,493	345,03
7	72836,213	33,333	140787,787	17,245	290,87
8	57688,807	33,333	110732,429	17,366	292,02

Tabela 3.3: Resultados do ensaio de repetibilidade

Número de ensaios	Média (µg/kg)	Desvio padrão (µg/kg)	Coef. de variação (%)
8	297,86	33,15	11,13

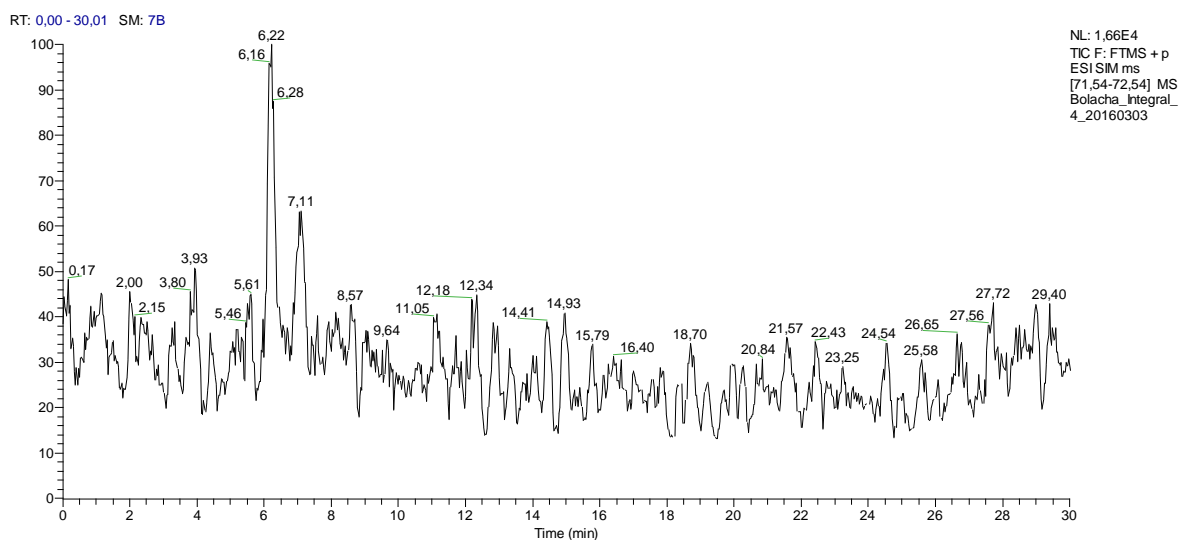


Figura 3.4: Exemplo de cromatograma de bolacha A

3.3 Análise da cor

Na Tabela 3.4 estão indicados os dados das componentes de cor analisadas. Pode observar-se que a variação da componente L (luminosidade) diminui ao longo da cozedura das bolachas para as bolachas A, B e C, enquanto na bolacha D aumenta. Este facto deve-se ao escurecimento da bolacha ao longo da cozedura, e por isso a uma alteração da componente L - diminuição (na maioria das bolachas) ou ligeiro aumento na bolacha D. Em relação à componente a (vermelho), verificou-se um aumento na maioria das bolachas (apenas na bolacha A não se observou esse aumento), o que demonstra o aumento da tonalidade vermelha, com o escurecimento das bolachas. A variação da componente b (amarelo) é diferente nas quatro bolachas: enquanto nas bolachas B e C aumenta, na bolacha A mantém-se e na bolacha D diminui, o que demonstra que é um parâmetro mais variável do que as duas componentes anteriores. Na Figura 3.5 estão representadas diferentes tonalidades de cor para uma referência de bolacha, e respetivas concentrações de acrilamida. É observável o aumento da concentração de AA, acompanhado do escurecimento da bolacha.

Tabela 3.4 - Análise da cor das bolachas com recurso ao colorímetro (L – luminosidade, a – vermelho, b – amarelo) ; os valores apresentados representam a média de três análises independentes

Bolacha	Zona de amostragem	L	a	b
A	forno 3	32,43	0,56	-0,92
	Centro	32,52	0,53	-0,91
	Margens	32,53	0,55	-0,92
B	forno 3	64,65	2,42	21,40
	Centro	59,12	6,03	23,71
	Margens	56,87	6,64	23,41
C	forno 3	55,22	8,98	17,34
	Centro	50,22	9,78	16,03
	Margens	50,57	9,90	16,08
D	forno 3	62,93	2,32	15,06
	Centro	63,43	2,65	14,97
	Margens	63,37	2,54	16,40

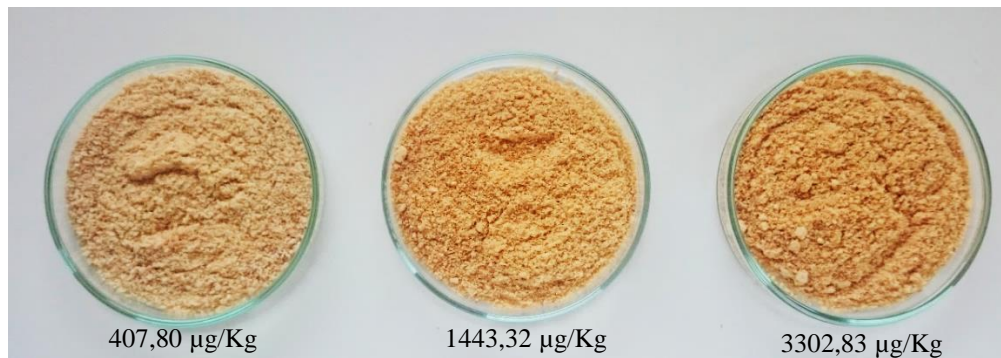


Figura 3.5: Diferentes tonalidades de cor de uma referência de bolacha analisada com informação dos teores de acrilamida

3.4 Teor de humidade

Os teores de humidade das quatro referências de bolachas e respetivas zonas de amostragem estão indicados na Tabela 3.5. É visível a redução da humidade da zona “forno 3” para as zonas “margens” e “centro”, correspondentes a bolachas totalmente cozidas.

Tabela 3.5: Teores de humidade nas bolachas por zona de amostragem

Bolacha	Zona de amostragem	Teor de humidade (%)
A	forno 3	1,18
	centro	0,27
	margens	0,43
B	forno 3	1,46
	centro	0,63
	margens	1,43
C	forno 3	1,88
	centro	0,51
	margens	0,38
D	forno 3	2,01
	centro	0,41
	margens	0,41

3.5 Teor de asparagina das matérias-primas

Na Tabela 3.6 verifica-se uma concentração de asparagina muito superior na sêmea de trigo, em comparação com a farinha de trigo T65, o que poderá explicar a elevada concentração de acrilamida na bolacha D, em relação às outras bolachas. Isto porque a bolacha D é fabricado com farinha de trigo e sêmea de trigo, ao contrário das restantes bolachas, que são produzidas apenas com farinha de trigo T65. Esta associação vai de encontro a outros estudos que demonstraram a relação entre farinhas “integrais” e maior formação de AA, pelo seu teor superior em asparagina (Mustatea et al. 2015, FDA 2016).

Tabela 3.6: Concentrações de asparagina na farinha de trigo e na sêmea de trigo, utilizadas no fabrico de bolachas

Matéria-prima	Concentração de asparagina (mg/kg)
Farinha de trigo	54,5
Sêmea de trigo (farelo)	691

3.6 Teor de acrilamida nas bolachas

A concentração de acrilamida nas quatro referências de bolachas analisadas foi muito variável, indicando que as diferenças na sua composição e condições de fabrico levam a uma maior ou menor formação de AA, podendo determinar, neste caso, valores abaixo ou acima dos valores indicativos da União Europeia. Conforme se pode observar na Tabela 3.7., a bolacha A apresentou uma concentração média de acrilamida (323,67 $\mu\text{g}/\text{kg}$) abaixo do valor indicativo da EFSA – 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (UE 2013), enquanto as bolachas B, C e D apresentaram concentrações de acrilamida acima deste valor - 557,10, 2056,11 e 2373,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respetivamente (Figura 3.5). Os valores de AA nas bolachas A e B vão de encontro a resultados de outros estudos (EFSA 2012), enquanto os das bolachas C e D são consideravelmente superiores. No entanto, numa outra quantificação de AA em bolachas foi encontrado um valor semelhante (Seródio 2015).

Ao longo da cozedura é notório o aumento dos teores de acrilamida em todas as bolachas, o que indica um aumento da formação da AA, acompanhada dum aumento da temperatura que é descrito na Tabela 1.3. Nas amostras retiradas do forno (“Forno 3”) obtiveram-se valores de concentrações de acrilamida inferiores aos das amostras “Margens” e “Centro” do tapete de cozedura, o que demonstra uma formação da acrilamida até ao final da cozedura. Como observado no gráfico apresentado na Figura 3.7, as bolachas do centro do tapete obtiveram concentrações de AA superiores às bolachas das margens do tapete, o que vai de encontro ao esperado, já que a zona central do forno é a que está sujeita a temperaturas superiores. A influência da temperatura na formação da acrilamida parece assim confirmada, tal como demonstrada em estudos anteriores (Van Der Fels-Klerx et al. 2014, Przygodzka et al. 2015). Os tempos e temperaturas de cozedura são idênticos nas quatro referências de bolachas, pelo que não é possível associá-los aos valores de acrilamida analisados.

A bolacha C obteve o segundo maior valor de concentração de AA. A sua única diferença em relação à bolacha A nas matérias-primas é a presença de cacau, o que poderá ser o fator responsável pelo valor elevado de AA. O cacau é uma matéria-prima com pré-tratamento térmico, sujeito a torrefação, e por isso propensa à formação de acrilamida (Delatour 2004). Seria necessária uma análise ao teor de acrilamida do cacau utilizado no fabrico da bolacha C para confirmar esta hipótese.

Tabela 3.7: Teores de acrilamida nas bolachas distribuídos por zonas de amostragem

Bolacha	Forno 3 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Margens do tapete ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Centro do tapete ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Média (exceto Forno 3) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
A	115,92	216,49	430,86	323,67
B	206,87	563,22	550,97	557,10
C	469,68	1880,84	2231,37	2056,11
D	407,80	1443,32	3302,83	2373,07

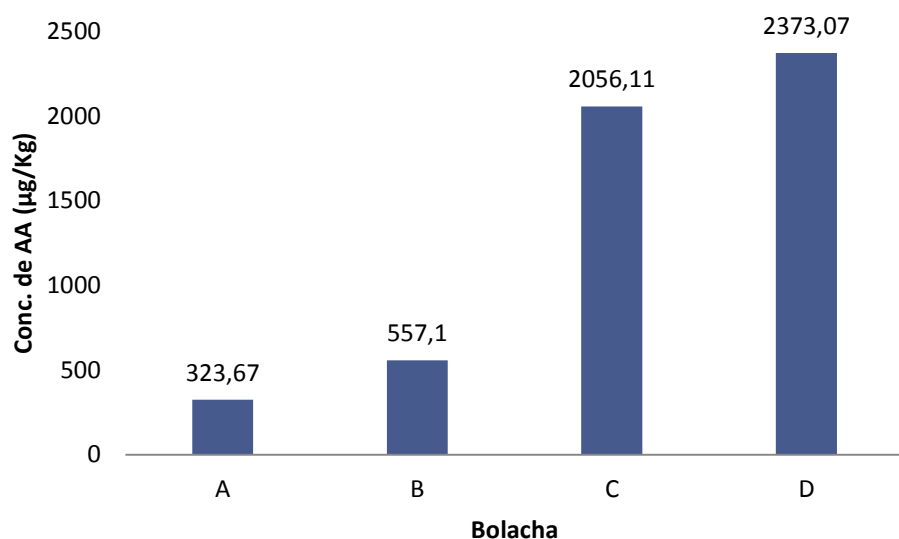


Figura 3.6: Teor médio de acrilamida nas bolachas A, B, C e D (exceto zona “Forno 3”)

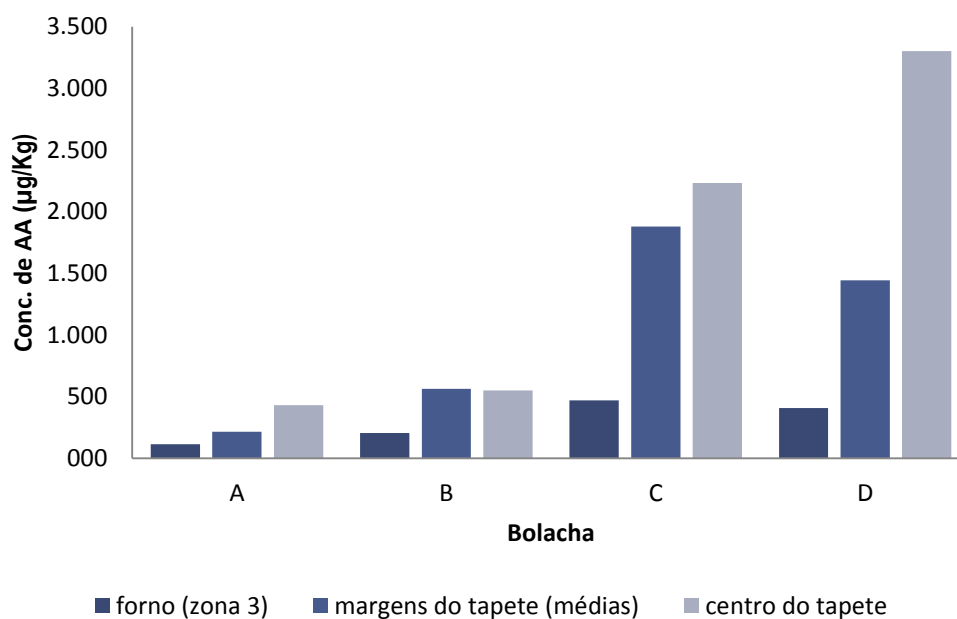


Figura 3.7: Teores de acrilamida distribuídos por zonas de amostragem

3.7 Correlação do teor de acrilamida com as restantes variáveis monitorizadas

Para relacionar o teor de acrilamida nas bolachas com as restantes variáveis analisadas foi aplicada a análise de componentes principais (PCA) e regressão linear múltipla (MLR). PCA é uma técnica multivariada que proporciona um método de extração a partir de uma matriz de variâncias e covariâncias ou correlação.

Numa análise aos seis fatores que influenciam o teor de AA nas bolachas (humidade, posição no tapete, tipo de bolacha, “luminosidade”, “vermelho” e “amarelo”) através de regressão linear múltipla (MLR), a variável melhor correlacionada com o teor de AA é o tipo de bolacha (F1), ou seja, genericamente é a composição das matérias-primas utilizadas em cada bolacha que mais influencia o aparecimento de acrilamida (Tabela 3.8). Como segunda variável escolhida está o teor de humidade, e como terceira variável a componente *a* (vermelho). A função matemática que permite prever o teor de acrilamida nas bolachas a partir das 6 variáveis é:

$$\text{Teor de AA} = -999,531 + 328,751 \text{ F1} - 160,097 \text{ F2} + 56,215 \text{ L} + 130,2 \text{ a} - 73,603 \text{ b} - 1111,056 \text{ teor de humidade}$$

$$R^2 = 0,799 \quad \text{Fitted R} = 0,557$$

Tabela 3.8: Melhor conjunto de variáveis explicativas por análise MLR às 6 variáveis; F1: tipo de bolacha (A, B, C ou D) F2: posicionamento no tapete do forno

	F1	F2	L	a	b	humidade	R ²
1 variável	X						0,344
2 variáveis	X					X	0,692
3 variáveis	X			X		X	0,688
4 variáveis	X	X		X		X	0,677
5 variáveis	X	X		X	X	X	0,624
6 variáveis	X	X	X	X	X	X	0,557

Esta análise vai de encontro à hipótese de que a maior influencia na formação da AA são as matérias-primas, e, principalmente, os teores de asparagina das farinhas de cereais. A bolacha D obteve o valor mais elevado de concentração de acrilamida - 2373,07 µg/kg. Este valor pode ser justificado pela sua composição, já que uma das suas matérias-primas é a sêmea de trigo. A sêmea de trigo é a parte externa do grão do trigo, aquela que é removida em farinhas como a farinha de trigo tipo 65. As farinhas “integrais” contêm na sua composição o

farelo de trigo, e estão associadas a maiores concentrações de asparagina, o aminoácido responsável pela maior via de formação de acrilamida. Outro tipo de matérias-primas que poderão aumentar a concentração de AA nas bolachas são as sujeitas a um tratamento térmico, como o cacau. Na bolacha C está também presente o cacau, o que poderá justificar o elevado teor de AA também nesta bolacha.

Se analisarmos apenas “dois pontos de amostragem” das bolachas totalmente cozidas (“margens” e “centro”), ou seja, bolachas prontas a consumir, e retirarmos as amostras “forno 3”, estamos apenas a comparar os produtos finais, principal objetivo no controlo das concentrações finais de AA. A análise por PCA resulta numa maior correlação do teor de AA com a Luminosidade. Isto não é surpreendente, uma vez que o teor de humidade e as matérias-primas, entre bolachas cozidas, perdem importância, e as componentes de cor ganham mais força. A segunda variável com maior correlação é a componente *a* (vermelho) (Tabela 3.9 e Figura 3.8). Embora estes resultados não sejam estatisticamente significativos, eles demonstram uma razoável correlação entre as concentrações de AA e as componentes de cor. Este escurecimento acompanhado do aumento do teor da acrilamida, embora neste trabalho não haja dados suficientes para demonstrar resultados estatisticamente significativos, vai de encontro aos resultados de outros estudos (Mustatea et al. 2005, Pedreschi et al. 2006, Gökmen et al. 2008, Gökmen et al. 2008a). O teor de humidade correlaciona-se inversamente com o teor de acrilamida, o que também não é surpreendente, uma vez que tempos e temperaturas superiores de cozedura originam bolachas com menor teor de humidade.

Tabela 3.9: Correlação de *Pearson* com 2 pontos de amostragem

	teor de AA	L	a	b	humidade
teor de AA	1,0	0,541	0,310	0,276	- 0,277
L	0,541	1,0	0,352	0,864	0,307
a	0,310	0,352	1,0	0,663	0,304
b	0,276	0,864	0,663	1,0	0,576
humidade	- 0,277	0,307	0,304	0,576	1,0

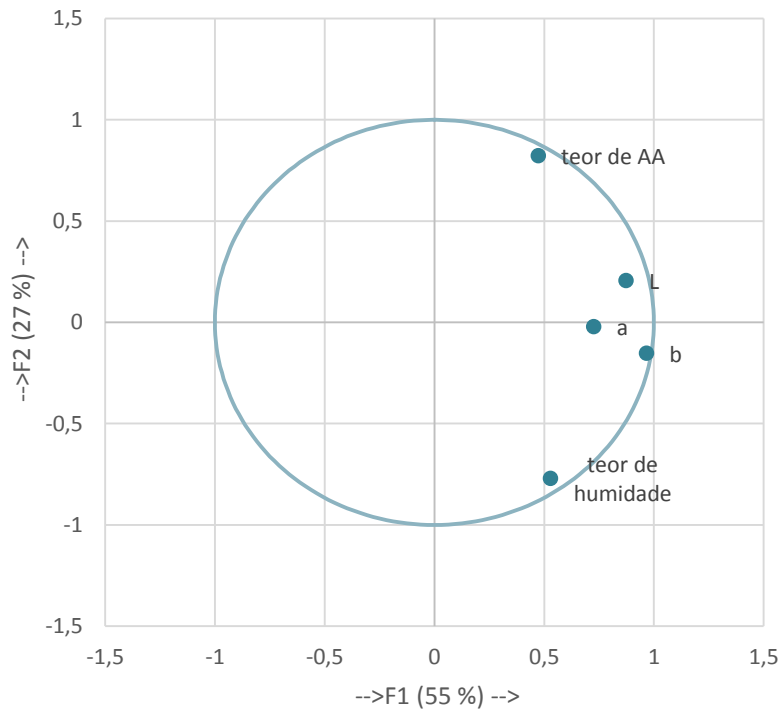


Figura 3.8 Análise PCA às variáveis com 2 pontos de amostragem (“margens” e “centro”)

Aplicando a análise por MLR com duas zonas de amostragem, a equação obtida é:

$$\text{Teor de AA} = -6713,849 + 200,699 L + 328,722 a - 294,856 b + 419,551 \text{ teor de humidade}$$
$$R^2 = 0,858 \quad \text{Fitted } R^2 = 0,668$$

Na tabela 3.10 estão indicados os subconjuntos das variáveis que melhor explicam a relação obtida na equação anterior. Como se poderá observar, a Luminosidade é novamente a variável mais relacionada com o teor de AA, seguida do teor de humidade, o que vai de encontro aos resultados obtidos na análise por PCA.

Tabela 3.10: Melhor conjunto de variáveis explicativas por análise MLR a dois pontos de amostragem (“margens” e “centros”)

	L	a	b	humidade	R²
1 variável	X				0,174
2 variáveis	X			X	0,312
3 variáveis	X	X	X		0,738
4 variáveis	X	X	X	X	0,668

4. Conclusão

Neste trabalho quantificou-se o teor de acrilamida de quatro referências de bolachas diferentes: A, B, C e D, com tempos e temperaturas de cozeduras diferentes. Os resultados obtidos situaram-se entre 323,67 e 2056,11 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O método de análise utilizado foi o LC-MS/MS, com ionização por *electrospray* e *Orbitrap* como analisador de massas, otimizado para matrizes de bolachas. O coeficiente de variação para o método aplicado foi de 11,13% (254,09 – 292,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

A concentração de acrilamida nas quatro referências de bolachas foi muito variável, indicando que as diferenças na sua composição e fabrico levam a uma maior ou menor formação de AA, podendo determinar, neste caso, valores abaixo ou acima dos valores indicativos da União Europeia.

Ao longo da cozedura foi observado um aumento da concentração da acrilamida, assim como se observaram diferenças entre as amostras colhidas em diferentes zonas do tapete de cozedura. O tipo de bolachas (genericamente considerando a composição das matérias-primas usadas) foi a variável estatisticamente mais correlacionada com o teor de AA quando consideradas todas as amostras, seguido do teor de humidade. As concentrações de asparagina nas farinhas de trigo “integrais” e a presença de ingredientes com pré-tratamento térmico foram considerados e associados a maiores concentrações de acrilamida.

Já quando se pretende prever o teor de acrilamida nas bolachas finais, considerando portanto apenas os parâmetros referentes a amostras finais (totalmente cozidas), a luminosidade (componente *L*) é a variável que melhor se correlaciona com o teor de acrilamida nas bolachas.

Um maior número de amostras e de análises seria benéfico para este trabalho, pois daria maior confiança nos resultados e suporte no tratamento estatístico. Também uma maior monitorização das matérias-primas e dos parâmetros de fabrico serão úteis para dar continuidade ao trabalho de mitigação da acrilamida em bolachas.

Conclui-se, assim, que são urgentes medidas de mitigação da acrilamida em bolachas. Entre elas poderão estar o controlo das farinhas, a adição de enzimas, a redução das temperaturas e aumento dos tempos e cozedura, assim como o controlo da cor dos produtos finais.

5. Referências Bibliográficas

- Adams, A., S. Hamdani, F. V. Lancker, S. Méjri and N. De Kimpe (2010). "Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles." *Food Research International* 43(5): 1517-1522.
- AFSCA (2013). "Determination Quantitative de la Teneur en Acrylamide dans les Aliments par UPLC-MS/MS." *Laboratoire de Liège MET-LFSAL* 139 2: 1-15.
- AFSSA (2003). "Acrylamide: Point d'information n°2." AFSSA – Saisine n° 2002-SA-0300, acedido a 15 de Outubro de 2015. disponível em: <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2002sa0300.pdf>.
- Albishri, H. M. and D. A. El-Hady (2014). "Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for the reliable determination of acrylamide in food samples." *Talanta* 118: 129-136.
- ANSES (2015). "AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail." Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail" - Saisine n° 2014-SA-0195 ACI-COP, acedido a 15 de Outubro de 2015, disponível em: <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT2014sa0195.pdf>.
- Arvanitoyannis, I. S. and N. Dionisopoulou (2014). "Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation." *Crit Rev Food Sci Nutr* 54(6): 708-733.
- Becalski, A., B. Brady, S. Feng, B. R. Gauthier and T. Zhao (2011). "Formation of acrylamide at temperatures lower than 100°C: the case of prunes and a model study." *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 28(6): 726-730.
- Bergmark, E. (1997). "Hemoglobin Adducts of Acrylamide and Acrylonitrile in laboratory workers, smokers and no smokers." *Chem. Res. Toxicol.* 10: 78-84.
- Berthod, L., G. Roberts and G. A. Mills (2014). "A solid-phase extraction approach for the identification of pharmaceutical-sludge adsorption mechanisms." *Journal of Pharmaceutical Analysis* 4(2): 117-124.
- Bjellaas, T., L. H. Stolen, M. Haugen, J. E. Paulsen, J. Alexander, E. Lundanes and G. Becher (2007). "Urinary acrylamide metabolites as biomarkers for short-term dietary exposure to acrylamide." *Food Chem Toxicol* 45(6): 1020-1026.
- Cerealis (2016). Acedido a 29 de Julho de 2016, disponível em: <http://www.cerealis.pt/produtosalimentares/historia.php>.
- Delatour, T., Périsset, A., Goldmann, T., Riediker, S. and Stadler, R. (2004) "Improved Sample Preparation to Determine Acrylamide in Difficult Matrixes Such as Chocolate Powder, Cocoa, and Coffee by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectroscopy." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4625-4631.
- EFSA (2012). "Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010." *EFSA Journal* 10 (10): 2938.
- EFSA (2015). "Scientific Opinion on Acrylamide in Food." *European Food Security Authority Journal*(6): 13-4104.
- Ehling S, Hengel, M., Shibamoto T. (2005). "Chemistry and Safety of Acrylamide in Food." (Formation of Acrylamide from Lipids). em "Advances in Experimental Medicine and Biology" 561: 223-233.
- Elbashir, A. A., M. M. Omar, W. A. Ibrahim, O. J. Schmitz and H. Y. Aboul-Enein (2014). "Acrylamide analysis in food by liquid chromatographic and gas chromatographic methods." *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 44(2):107-141.

- Elmore, J. S., A. Briddon, A. T. Dodson, N. Muttucumaru, N. G. Halford and D. S. Mottram (2015). "Acrylamide in potato crisps prepared from 20 UK-grown varieties: effects of variety and tuber storage time." *Food Chemistry* 182: 1-8.
- FDE (2011). "Food Drink Europe Acrylamide Toolbox 2011", acessado a 10 de Outubro de 2015, disponível em:
http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/Toolboxfinal260911.pdf
- FAO/WHO (2002). "FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food", acessado a 1 de Outubro de 2015, disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42563/1/9241562188.pdf>
- FAO/WHO (2005). "Joint FAO/WHO expert committee on food additives". Sixty-fourth meeting (Contaminants) of JECFA, acessado a 2 de Outubro de 2015, disponível em:
ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_call.pdf
- FDA (2016). "Guidance for Industry Acrylamide in Foods - U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration and Center for Food Safety and Applied Nutrition", acessado a 30 de Novembro de 2015, disponível em:
<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/UCM374534.pdf>
- Friedman, M. (2003). "Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (51): 4504–4526.
- Gökmen, V., Ö. Ç. Açar, G. Arribas-Lorenzo and F. J. Morales (2008). "Investigating the correlation between acrylamide content and browning ratio of model cookies." *Journal of Food Engineering* 87(3): 380-385.
- Gökmen, V., Ö. Ç. Açar, A. Serpen and F. J. Morales (2008a). "Effect of leavening agents and sugars on the formation of hydroxymethylfurfural in cookies during baking." *European Food Research and Technology* 226(5): 1031-1037.
- Hellenäs, K.-E., L. Abramsson-Zetterberg and K. Skog (2005). "The HEATOX Project." *Journal of AOAC International* 88(1): 242-245.
- Hoenicke, K. and R. Gatermann (2005). "Studies on the Stability of Acrylamide in Food During Storage." *Journal of AOAC International* 88(1): 268-273.
- Hu, Q., X. Xu, Y. Fu and Y. Li (2015). "Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review." *Food Control* 56: 135-146.
- Jin, X., Coughlan, M., Roberts, J., Mehta, R., Raju, J. (2016). "Dietary acrylamide exposure in male F344 rats: Dataset of systemic oxidative stress and inflammation markers" *Data in Brief*: 7: 460-467.
- Jolliffe, I. T. (1986). *Principal Component Analysis*, Springer: New York.
- Kolek, E., P. Šimko and P. Simon (2006). "Inhibition of acrylamide formation in asparagine/d-glucose model system by NaCl addition." *European Food Research and Technology* 224(2): 283-284.
- Katen, A.L., Stanger, S.J., Anderson, A.L., Roman S.D. (2016). "Chronic acrylamide exposure in male mice induces DNA damage to spermatozoa; Potential for amelioration by resveratrol." *Journal of Reproductive Toxicology* 63: 1-12.
- Liu, C., F. Luo, D. Chen, B. Qiu, X. Tang, H. Ke and X. Chen (2014). "Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods." *Talanta* 123: 95-100.
- Manley, D. (2000). "Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies." Woodhead Publishing in Food Science and Technology. 3ª edição, Taylor & Francis pp. 499.
- Maurus Biedermann, S. B.-B., Anja Noti and Koni Grob (2003). "Two GC-MS Methods for the Analysis of Acrylamide." *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* (94): 406-422.

- Michalak, J., E. Gujska and A. Kuncewicz (2013). "RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods." *Journal of Food Composition and Analysis* 32(1): 68-73.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., & Dodson, A. T. (2002). "Acrylamide is formed in the Maillard reaction." 419: 448-449.
- Mustafa, A., R. Andersson, J. Rosén, A. Kamal-Eldin and P. Åman (2005). "Factors Influencing Acrylamide Content and Color in Rye Crisp Bread." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(15): 5985-5989.
- Mustatea, G., M. E. Popa, M. Negoita and F. I. Roming (2015). "Asparagine and sweeteners – how they influence acrylamide formation in wheat flour biscuits?" *Journal of Biotechnology* 208: S81.
- NSF (1988) Drinking water treatment chemicals — health effects. Ann Arbor, MI, National Sanitation Foundation (Standard 60-1988).
- Nguyen, H. T., H. J. Van der Fels-Klerx, R. J. Peters and M. A. Van Boekel (2016). "Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: Part I: Effects of sugar type." *Food Chemistry* 192: 575-585.
- Oracz, J., E. Nebesny and D. Żyżelewicz (2011). "New trends in quantification of acrylamide in food products." *Talanta* 86: 23-34.
- Park, D. L., S. Coates, V. A. Brewer, E. A. E. Garber, M. Abouzied, K. Johnson, B. Ritter and D. McKenzie (2005). "Performance Tested Method SM Multiple Laboratory Validation Study of ELISA-Based Assays for the Detection of Peanuts in Food." *Journal of AOAC International* 88(1): 156-160.
- Pedreschi, F., K. Kaack and K. Granby (2006). "Acrylamide content and color development in fried potato strips." *Food Research International* 39(1): 40-46.
- Polly E. Boona, A. d. M., Hilko van der Voetb, Gerda van Donkersgoed, and J. D. v. K. Marie Brettec (2005). "Calculations of dietary exposure to acrylamide." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 580 143-155.
- Postles, J., S. J. Powers, J. S. Elmore, D. S. Mottram and N. G. Halford (2013). "Effects of variety and nutrient availability on the acrylamide-forming potential of rye grain." *Journal of Cereal Science* 57(3): 463-470.
- Przygodzka, M., M. K. Piskula, K. Kukurová, Z. Ciesarová, A. Bednarikova and H. Zieliński (2015). "Factors influencing acrylamide formation in rye, wheat and spelt breads." *Journal of Cereal Science* 65: 96-102.
- Rak, K., F. M. Navarro and J. P. Palta (2013). "Genotype × Storage Environment Interaction and Stability of Potato Chip Color: Implications in Breeding for Cold Storage Chip Quality." *Crop Science* 53(5): 1944-1952.
- Reynolds, T. (2002). "Acrylamide and Cancer: Tunnel Leak in Sweden Prompted Studies." *Journal of the National Cancer Institute* 94 (12): 876-878.
- Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlson, P., Ehrenberg, L. and Törnqvist, M. (2003). "Investigations of Factors That Influence the Acrylamide Content." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7012-7018.
- Serôdio, A. (2015). "Acrilamida em bolachas: ocorrência, análise e estratégias de mitigação." *Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro; Departamento de Química, acedido a 30 de Novembro de 2015, disponível em <http://ria.ua.pt/bitstream/10773/14833/1/TESE.pdf>.*
- Sirot, V., Hommet, F., Tard, A., Leblanc, C. (2012). "Dietary acrylamide exposure of the French population_Results of the second french total diet study." *Food and Chemical Toxicology* (50): 889-894.
- Skog, J. and J. Alexander (2006). "Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods." 1ª edição: pp 536.
- Soares, C. (2015). "Assessment of the dietary intake of acrylamide in Portugal." *Tese de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas, Especialidade de Nutrição e Química dos*

- Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, acessado a 17 de Outubro, disponível em <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/78676/2/114101.pdf>.
- Sörgel, F., R. Weissenbacher, M. Kinzig-Schippers, A. Hofmann, M. Illauer, A. Skott and C. Landersdorfer (2003). "Acrylamide: Increased Concentrations in Homemade Food and First Evidence of Its Variable Absorption from Food, Variable Metabolism and Placental and Breast Milk Transfer in Humans." *Chemotherapy* 48(6): 267-274.
- Stadler, R. H. and G. Scholz (2004). "Acrylamide: An Update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanisms of Formation, and Potential Strategies of Control." *Nutrition Reviews* 62(12): 449-467.
- Tareke, E., P. R., Patrik Karlsson, Sune Eriksson, and M. Totnqvist (2002). "Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuff." *J. Agric. Food Chem.* 50: 4998-5006.
- Tran, NL., Barraj, M., Murphy, M., Bi, X. (2010). "Dietary Acrylamide Exposure and Hemoglobin Adducts – National Health and Nutrition Examination Survey (2003-04)." *Food and Chemical Toxicology* 48: 3098–3108.
- UE (2013). "Recomendação da CE relativa à investigação dos teores de acrilamida nos alimentos." *Jornal Oficial da União Europeia* L301: 15-17, acessado a 30 de Outubro, disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013H0647&from=PT>
- US-EPA (2007). "Toxicological review of acrylamide" in Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), acessado a 20 de Outubro de 2015, disponível em:
file:///C:/Users/cfernandes/Downloads/ACRYLAMIDE_TOXREV_ERD.PDF
- Van Der Fels-Klerx, H. J., E. Capuano, H. T. Nguyen, B. Ataç Mogol, T. Kocadağlı, N. Göncüoğlu Taş, A. Hamzalıoğlu, M. A. J. Van Boekel and V. Gökmen (2014). "Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: NaCl and temperature–time profile effects and kinetics." *Food Research International* 57: 210-217.
- Yaylayan, V., Wnorowski A. and Locas, P. (2003). "Why Asparagine Needs Carbohydrates To Generate Acrylamide." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6): 1753-1757.
- Vikstrom, A. C., M. Warholm, B. Paulsson, A. Axmon, E. Wirfalt and M. Tornqvist (2012). "Hemoglobin adducts as a measure of variations in exposure to acrylamide in food and comparison to questionnaire data." *Food and Chemical Toxicology* 50(7): 2531-2539.
- Wenzl, T., B. de la Calle M. and Anklam, E. (2003). "Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review." *Food Additives & Contaminants* 20(10): 885-902.
- WHO (1994). "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human - Acrylamide" 60: 389-433.
- WHO (1999). "Acrylamide. International Programme on Chemical Safety. Poisons Information Monograph. 652. Acrylamide." Acessado a 1 de Dezembro de 2015, disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim652.htm>.
- WHO (2002). "Health implications for acrylamide in food.". Report of a Joint FAO/WHO Consultation, acessado a 10 de Dezembro de 2015, disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42563/1/9241562188.pdf>.
- Xu, F., M. J. Oruna-Concha and J. S. Elmore (2016). "The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food." *Food Chem* 210: 163-171.
- Xu, Y., Cui, B, Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G., Shi, J. (2014). "Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects." *Food and Chemical Toxicology* 69: 1-12.

- Yaylayan, V. A. and R. H. Stadler (2005). "Acrylamide Formation in Food: A Mechanistic Perspective." *Journal of AOAC International* 88(1): 262-267.
- Zenick, H., Hope, E., Smith, K. (1986). "Reproductive toxicity associated with acrylamide treatment in male and females rats." *Journal of Toxicology and Environmental Health* 17(4): 457-472.