



ANDREIA FILIPA
FRANCISCO DAS
NEVES

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA
ANÁLISE DE POLÍOIS EM
ALIMENTOS, POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ULTRA EFICIÊNCIA**

Relatório de estágio do Mestrado em Engenharia
Biológica e Química

ORIENTADORA

Professora Doutora Maria de Lurdes Gameiro

SUPERVISORA

Mestre Vera Canelas

Junho de 2022

ANDREIA FILIPA
FRANCISCO DAS
NEVES

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA
ANÁLISE DE POLÍOIS EM
ALIMENTOS, POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ULTRA EFICIÊNCIA**

JÚRI

Presidente: Professora Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório, Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal

Supervisora: Mestre Vera Cristina Calção Canelas, SGS Portugal, S.A.

Vogal: Professora Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria

Junho de 2022

Aos meus pais: Paula e Paulo
pelo exemplo de vida, apoio e carácter.

Com todo o meu amor

DEDICO

*“As raízes dos estudos são amargas,
mas seus frutos são doces”*

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

As minhas primeiras palavras de agradecimento são dirigidas à SGS, pela confiança e por me ter proporcionado os meios necessários para o desenvolvimento deste estágio que me enriqueceu tanto a nível pessoal como profissional.

De seguida quero agradecer à Doutora Vera Canelas por ter aceite ser minha supervisora, pela disponibilidade e prontidão para qualquer esclarecimento, e principalmente, obrigado pelo exemplo de profissionalismo.

Um agradecimento à Engenheira Beatriz Anacleto por me acolher tão bem na empresa, pela paciência que teve, pela confiança que depositou em mim e por tudo o que me ensinou ao longo do estágio. Deixo também aqui um agradecimento a todos os técnicos do laboratório de química da SGS, por me receberem tão bem, tornando o ambiente mais acolhedor.

À Professora Doutora Maria de Lurdes de Gameiro, coordenadora do Curso do Mestrado, por ter aceite ser minha orientadora e pelo seu constante acompanhamento durante o tempo de estágio, o meu mais sincero obrigado.

Um obrigado também à Escola Superior de Tecnologia do Barreiro – Instituto Politécnico de Setúbal, e a todos os docentes que me lecionaram durante o mestrado.

À minha família, principalmente aos meus pais, quero agradecer por terem apostado na minha formação académica, por serem os meus pilares, pelo amor, paciência, dedicação, encorajamento e valores que me transmitiram. Um agradecimento especial ao meu avô, que apesar de já não estar presente, sempre me incentivou a nunca desistir dos meus sonhos e que me ensinou que nada se consegue sem esforço.

Por fim, e não menos importante, agradeço ao meu namorado por estar presente em todos os momentos importantes, por me ter feito sentir capaz de superar qualquer adversidade, pelos conselhos e principalmente por todo o amor que me deu e continua a dar.

RESUMO

Os polióis são carboidratos provenientes da hidrogenação da sua fonte de açúcar, em que o grupo carbonilo do aldeído ou da cetona é reduzido a um grupo hidroxilo primário ou secundário. Na indústria alimentar, os polióis têm vindo a ser cada vez mais utilizados como substitutos da sacarose, em consequência da maior procura por um estilo de vida mais saudável ou devido a doenças como a diabetes ou obesidade.

Neste âmbito, a empresa SGS quis validar um método que permitisse quantificar, com elevada confiança, polióis presentes nas formulações de diversos alimentos, através da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência com deteção por índice de refração. A validação engloba os polióis xilitol, sorbitol e maltitol.

Inicialmente, o método começou por demonstrar ser específico e seletivo, uma vez que ao injetar soluções individuais e conjuntas de polióis, e variando a concentração, não se verifica influência no seu tempo de retenção. Para cada um dos polióis referidos, o método foi considerado linear e mostrou ser mais sensível para a quantificação de maltitol e sorbitol do que para xilitol. O limite de quantificação diz respeito ao padrão de menor concentração, isto é, 0,05%. Verificou-se que a gama de trabalho de 0,05% a 3% era adequada pois através do teste de homogeneidade de variâncias confirmou-se que as variâncias nos limites da gama de trabalho não são significativamente diferentes. Para a repetibilidade realizaram-se 10 réplicas do padrão de 0,05% e de 3% para cada analito, bem como de amostra. Analisaram-se de seguida os coeficientes de variação da repetibilidade, que se verificaram estar abaixo do limite estabelecido de 10%. Para a precisão intermédia foram realizadas 3 réplicas do padrão de 0,05% e de 3%, assim como de amostra, em 3 dias diferentes. O objetivo era verificar qual a influência do fator dia nos resultados obtidos. Dados os baixos coeficientes de variação registados, o método mostrou ser preciso, comprovando assim que o fator dia não teve influência nos resultados obtidos. A exatidão foi avaliada com base em ensaios de recuperação, sendo que as taxas de recuperação deveriam estar compreendidas no intervalo de 80 % a 120 % para a exatidão ser considerada satisfatória. Como todas as taxas de recuperação obtidas estavam dentro deste intervalo, pôde afirmar-se que o método possui uma boa exatidão.

Dado que todos os parâmetros testados apresentaram resultados satisfatórios, a validação do método foi bem-sucedida.

PALAVRAS-CHAVE: sacarose, validação, xilitol, sorbitol, maltitol.

ABSTRACT

Polyols are carbohydrates resulting from the hydrogenation of their sugar source, in which the carbonyl group of the aldehyde or ketone is reduced to a primary or secondary hydroxyl group. In the food industry, polyols have been increasingly used as sucrose substitutes, as a result of the greater demand for a healthier lifestyle or due to diseases such as diabetes or obesity.

In this context, the company SGS wanted to validate a method that would make it possible to quantify, with high confidence, the polyols present in the formulations of various foods, through the technique of ultra-performance liquid chromatography with refractive index detection. The validation encompasses xylitol, sorbitol and maltitol polyols.

Initially, the method began by demonstrating to be specific and selective, since when injecting individual and joint solutions of polyols and varying the concentration, there is no influence on their retention time. For each of the mentioned polyols, the method was considered linear and proved to be more sensitive for the quantification of maltitol and sorbitol than for xylitol. The limit of quantification refers to the lowest concentration standard, ie 0.05%. It was found that the working range of 0.05% to 3% was adequate because through the variance homogeneity test was confirmed that the variances at the limits of the working range are not significantly different. For repeatability, 10 replicates of the 0.05% and 3% standard were performed for each analyte, as well as the sample. The repeatability coefficients of variation were analyzed below, which were found to be below the established limit of 10%. For intermediate precision, 3 replicates of the 0.05% and 3% standard, as well as the sample, were performed on 3 different days. The objective was to verify the influence of the day factor on the results obtained. Given the low coefficients of variation recorded, the method proved to be precise, thus proving that the day factor had no influence on the results obtained. Accuracy was evaluated based on recovery tests, and recovery rates should be in the range of 80% to 120% for accuracy to be considered satisfactory. As all the recovery rates obtained were within this range, it could be stated that the method has good accuracy.

As all parameters tested showed satisfactory results, the validation of the method was successful.

KEYWORDS: sucrose, validation, xylitol, sorbitol, maltitol.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	v
1. A Empresa – Grupo SGS	1
2. Enquadramento Teórico.....	3
3. Cromatografia	5
3.1. Cromatografia Líquida	5
3.2. HPLC	6
3.2.1. Equipamento	6
• Bomba.....	7
• Injetor.....	7
• Coluna.....	7
• Forno da Coluna	7
• Detetor	8
3.2.2. Vantagens e Desvantagens	8
3.3. UPLC (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)	8
4. Introdução Teórica	9
4.1. Sacarose	9
4.2. Aditivos Alimentares	10
4.2.1. Adoçantes / Edulcorantes.....	11
4.2.1.1. Adoçantes Não Nutritivos / Artificiais	12
4.2.1.2. Adoçantes Nutritivos.....	13
4.3. Polióis	13
4.3.1. Aplicações dos Polióis.....	14
4.3.2. Maltitol.....	15
4.3.3. Sorbitol.....	16
	vii

4.3.4. Xilitol	17
5. Validação de Métodos Analíticos.....	19
5.1. Avaliação Indireta	19
5.1.1. Especificidade e Seletividade	19
5.1.2. Quantificação	20
• Curvas de Calibração	20
• Gama de Trabalho	21
• Linearidade	21
• Sensibilidade (S)	22
• Desvio-padrão do método (Sm).....	23
• Limiares Analíticos	23
5.1.3. Precisão	24
• Repetibilidade	24
• Reprodutibilidade	25
• Precisão Intermédia	26
5.2. Avaliação Direta.....	26
5.2.1. Materiais de Referência Certificados (MRC).....	27
• Erro Relativo (ER)	27
• Fator de Desempenho (“Z-Score”)	27
• Erro Normalizado (EN)	28
5.2.2. Ensaios Interlaboratoriais.....	28
5.2.3. Testes Comparativos	28
5.2.4. Ensaios de Recuperação	28
6. Secção Experimental	31
6.1. Reagentes	31
6.2. Materiais e Equipamentos.....	31
6.3. Procedimento Experimental	31
6.3.1. Preparação da fase móvel.....	31
6.3.2. Preparação da solução-mãe padrão (5% m/v)	32

6.3.3. Preparação dos padrões para a curva de calibração.....	32
6.3.4. Matriz Alimentar	32
6.3.5. Preparação da Amostra	32
6.3.6. Ensaios de Recuperação	32
6.3.7. Condições Cromatográficas	33
7. Resultados e Discussão	35
7.1. Especificidade e Seletividade	35
7.1.1. Especificidade	35
• Xilitol	35
• Sorbitol.....	36
• Maltitol.....	36
7.1.2. Seletividade.....	37
7.2. Curvas de Calibração e Linearidade	38
• Xilitol	38
• Sorbitol.....	39
• Maltitol.....	41
7.3. Gama de Trabalho	42
• Xilitol	43
• Sorbitol.....	43
• Maltitol.....	44
7.4. Sensibilidade (S).....	45
7.5. Desvio-padrão do Método.....	46
7.6. Limiares Analíticos.....	46
7.7. Precisão.....	47
7.7.1. Repetibilidade	47
• Xilitol	47
• Sorbitol.....	48
• Maltitol.....	49
• Amostra.....	50
7.7.2. Precisão Intermédia	50

• Xilitol	51
• Sorbitol.....	51
• Maltitol.....	52
• Amostra.....	52
7.8. Exatidão.....	53
• Xilitol	53
• Sorbitol.....	54
• Maltitol.....	55
8. Conclusão	57
9. Referências Bibliográficas	59
10. ANEXOS.....	63
ANEXO 1	63
ANEXO 2	65
ANEXO 3	66
ANEXO 4	67
ANEXO 5	67
ANEXO 6	68
ANEXO 7	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Logotipo da SGS.....	1
Figura 2: Componentes de um sistema de HPLC.....	7
Figura 3: Estrutura Química da Sacarose.....	9
Figura 4: Classificação dos aditivos de acordo com as suas características funcionais.....	11
Figura 5: Representação das reações: 1- redução de um aldeído a um grupo hidroxilo primário; 2- redução de uma cetona a um grupo hidroxilo secundário	13
Figura 6: Estrutura química do maltitol	16
Figura 7: Estrutura química do sorbitol	17
Figura 8: Estrutura química do xilitol	18
Figura 9: Esquema representativo da relação entre a exatidão e a precisão: A) boa exatidão e boa precisão, B) má exatidão, mas boa precisão, C) boa exatidão, mas má precisão e D) má exatidão e má precisão	26
Figura 10: Cromatograma obtido para o padrão 6.....	37
Figura 11: Representação gráfica de uma curva de calibração obtida para o xilitol	39
Figura 12: Representação gráfica de uma curva de calibração obtida para o sorbitol	40
Figura 13: Representação gráfica de uma curva de calibração obtida para o maltitol.....	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características das subclasses dos adoçantes.....	11
Tabela 2 – Higroscopicidade e calor de solução característicos de cada poliol	14
Tabela 3 – Valores de índice glicémico no sangue, para cada tipo de poliol.....	15
Tabela 4 – Volumes a pipetar da solução-mãe padrão para a construção da curva de calibração	32
Tabela 5 – Tempos de retenção e áreas de pico obtidos para o xilitol	35
Tabela 6 – Tempos de retenção e áreas de pico obtidos para o sorbitol	36
Tabela 7 – Tempos de retenção e áreas de pico obtidos para o maltitol.....	36
Tabela 8 – Listagem das diferentes equações da reta e coeficientes de determinação, obtidos nos diferentes dias de trabalho, relativos ao xilitol.....	38
Tabela 9 – Avaliação da linearidade da reta de calibração do xilitol através do teste de RIKILT	39
Tabela 10 – Listagem das diferentes equações da reta e coeficientes de determinação, obtidos nos diferentes dias de trabalho, relativos ao sorbitol	40
Tabela 11 – Avaliação da linearidade da reta de calibração do sorbitol através do teste de RIKILT	41
Tabela 12 – Listagem das diferentes equações da reta e coeficientes de determinação, obtidos nos diferentes dias de trabalho, relativos ao maltitol	41
Tabela 13 – Avaliação da linearidade da reta de calibração do maltitol através do teste de RIKILT	42
Tabela 14 – Avaliação da gama de trabalho segundo o teste de homogeneidade de variâncias, para o xilitol	43
Tabela 15 – Avaliação da gama de trabalho segundo o teste de homogeneidade de variâncias, para o sorbitol.....	43

Tabela 16 – Avaliação da gama de trabalho segundo o teste de homogeneidade de variâncias, para o maltitol	44
Tabela 17 – Sensibilidade e desvio-padrão associado, obtidos para os polióis em estudo	45
Tabela 18 – Apresentação dos valores de desvio-padrão obtidos para cada poliól	46
Tabela 19 – Valores obtidos para os limites de quantificação e de detecção	46
Tabela 20 – Avaliação da repetibilidade para o xilitol: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CVr) e limite de repetibilidade (Δr)	47
Tabela 21 – Avaliação da repetibilidade para o sorbitol: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CVr) e limite de repetibilidade (Δr)	48
Tabela 22 – Avaliação da repetibilidade para o maltitol: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CVr) e limite de repetibilidade (Δr)	49
Tabela 23 – Avaliação da repetibilidade na amostra: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CVr) e limite de repetibilidade (Δr)	50
Tabela 24 – Resultados obtidos na análise da precisão para quantificação de xilitol	51
Tabela 25 – Resultados obtidos na análise da precisão para quantificação de sorbitol	51
Tabela 26 – Resultados obtidos na análise da precisão para quantificação de maltitol	52
Tabela 27 – Resultados obtidos na análise da precisão para quantificação de maltitol na amostra em estudo	52
Tabela 28 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o xilitol ao nível do LQ (0,05%) ..	53
Tabela 29 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o xilitol no nível médio de fortificação (1,00%)	54
Tabela 30 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o xilitol no nível alto de fortificação (3,00%)	54
Tabela 31 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o sorbitol ao nível do LQ (0,05%)	54
Tabela 32 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o sorbitol no nível médio de fortificação (1,00%)	55
Tabela 33 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o sorbitol no nível alto de fortificação (3,00%)	55
Tabela 34 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o maltitol ao nível do LQ (0,05%)	55
Tabela 35 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o maltitol no nível médio de fortificação (1,00%)	56

Tabela 36 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o maltitol no nível alto de fortificação (3,00%)	56
---	-----------

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

b – Ordenada na origem

C_{analito} – Concentração do analito

C_{inicial} – Concentração de analito na amostra antes da fortificação

C_{obtida} – Concentração final de analito na amostra após a fortificação

C_{sp} – Concentração da solução padrão de maior concentração

CLC – Cromatografia Líquida Clássica

CV – Coeficiente de Variação

CV_{PI} – Coeficiente de Variação da precisão intermédia

CV_r – Coeficiente de Variação da repetibilidade

DP – Desvio-padrão relativo do método

Δx – Variação da concentração

Δy – Variação do sinal analítico

ΔR – Limite de reprodutibilidade

ER – Erro Relativo

En – Erro Normalizado

F – Valor crítico da distribuição de *Snedecor / Fisher*

FDA – *Food and Drug Administration*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

m – Declive das retas

MRC – Materiais de Referência Certificados

N – nº de pontos da reta de calibração

N_i – nº de repetições

n – nº de réplicas

OMS – Organização Mundial de Saúde

R – Taxa de recuperação

r – Coeficiente de correlação linear

r² – Coeficiente de determinação

RID – *Refractive Index Detector*

S – Sensibilidade

s – Desvio-padrão

S_{PI} – Desvio-padrão da precisão intermédia

S_m – Desvio-padrão do método

S_{ri} – Desvio-padrão da repetibilidade

S_{RI} – Desvio-padrão da reprodutibilidade

$S_{y/x}$ – Desvio-padrão residual

s^2 – Variância

SGS – *Société Générale de Surveillance*

t_r – Tempo de retenção

TV – Valor teste

UV – Ultravioleta

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography

U_{ref}^2 – Incerteza associada ao valor verdadeiro

U_{lab} – Incerteza do laboratório

x – Concentração

$\bar{x}$ – Médias das concentrações

x_v – Valor considerado verdadeiro

X_{lab} – Valor obtido experimentalmente

y – Sinal analítico

$\bar{y}$ – Médias dos sinais analíticos

Z – Fator de Desempenho

1. A EMPRESA – GRUPO SGS



Figura 1: Logotipo SGS [1].

A SGS - *Société Générale de Surveillance*, fundada em Genebra (Suíça) em 1878, é hoje uma empresa de renome, presente em mais de 140 países, com escritórios e laboratórios fixos em quatro continentes, empregando mais de 93.000 funcionários [1].

Os valores pelos quais a SGS se rege: Integridade, Espírito Empreendedor e Inovação, são considerados os alicerces para a organização e sucesso da empresa [1].

Atualmente, a SGS é líder mundial em inspeção, verificação, testes e certificação, e é também uma referência mundial em qualidade e integridade, abrangendo os mais diversos setores, entre os quais se destacam o industrial, o automóvel, o alimentar e o têxtil [1].

Em 1922 a SGS iniciou a sua atividade em Portugal, desenvolvendo serviços de Certificação de Sistemas, Inspeção, Gestão de Risco, Testes e Análises, Consultoria Técnica e Formação, entre outros [1].

Hoje em dia, existem em Portugal uma sede – em Lisboa – e seis filiais – em Sines, Leça da Palmeira, Maia, Funchal, Póvoa de Santa Iria e Ponta Delgada. A rede mundial de escritórios e a interação profissional entre todos eles garantem a cobertura de todos os serviços prestados em qualquer parte do mundo, sendo essa uma das principais razões pelo crescimento deste grande grupo [1].

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

A qualidade alimentar é um dos fatores mais decisivos na hora da compra de um determinado produto, e está relacionada com a percepção que cada consumidor tem acerca desse produto. As principais características avaliadas pelos consumidores são o sabor, o odor, a textura, entre outros [2].

Com um mercado cada vez mais competitivo, encontrar um meio de ganhar visibilidade e atrair consumidores, tornou-se um objetivo de primeira necessidade para o sucesso de qualquer empresa [3]. Para atingir esse objetivo, as empresas optam ou por inovar os produtos já existentes, ou por lançar novos produtos no mercado. A inovação que o consumidor procura pode estar de acordo com o prazer, a saúde, o bem-estar, a sustentabilidade e ainda a conveniência [4].

No que diz respeito à saúde, o açúcar, ou a quantidade deste presente nos alimentos, é considerado um perigo [4]. Quando consumido em excesso, pode originar diversas doenças, nomeadamente diabetes e obesidade. Ambas as doenças estão relacionadas com o consumo excessivo de ácidos gordos saturados e de alimentos ricos em açúcar, incluindo bebidas.

Como solução para a elevada concentração de açúcar presente nos alimentos e bebidas, surgiu a possibilidade de adicionar edulcorantes às formulações dos produtos alimentares, que atuam como substitutos do açúcar, como é o caso dos polióis [5].

O objetivo do estágio curricular desenvolvido no Laboratório de Química da SGS, consistiu na testagem e validação de um método analítico para a determinação de polióis em produtos alimentares por cromatografia líquida de ultra eficiência, com detetor de índice de refração (*Ultra Performance Liquid Chromatography – Refractive Index Detector*: UPLC-RID).

3. CROMATOGRAFIA

De um modo geral, os métodos para análise química são seletivos e nem todos são específicos. Consequentemente, a separação do analito de potenciais interferências é, na grande maioria dos casos, uma etapa crucial [6].

Devido à grande facilidade em separar, identificar e quantificar espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos, podendo ser utilizada isoladamente ou em simultâneo com outras técnicas instrumentais de análise [7].

De acordo com a definição da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a cromatografia é um método físico de separação em que os componentes a separar são distribuídos entre duas fases, a fase estacionária, com uma grande área superficial e imóvel ao longo de todo o processo, e a fase móvel que se move numa direção definida. Em geral, a cromatografia implica a passagem dos componentes da amostra através de um meio com o qual interatuam fisicamente – a fase estacionária, sendo arrastados por um fluido – a fase móvel. A separação das moléculas resulta das diferenças de afinidades e interações com a fase estacionária. Componentes da amostra que tenham maior afinidade com a fase estacionária irão mover-se mais lentamente, ou seja, são retidos durante mais tempo do que os componentes com interações mais fracas, que serão os primeiros a eluir. É devido a estas diferenças de velocidades que os componentes químicos podem ser separados uns dos outros e identificados, em condições específicas [8,9].

De acordo com a natureza da fase móvel, a cromatografia pode ser classificada em: cromatografia líquida, cromatografia gasosa e cromatografia de fluido supercrítico, sendo que para este trabalho apenas se destaca a cromatografia líquida [8].

3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida é uma técnica analítica importante tendo em conta que a maioria dos analitos não são suficientemente voláteis para serem separados por cromatografia gasosa [10,11]. Esta técnica envolve a injeção de um pequeno volume de amostra líquida num tubo cheio de partículas porosas, fase estacionária, onde os componentes individuais da amostra são transportados ao longo do tubo de enchimento, a coluna, por um líquido movido pela força da gravidade, fase móvel. A cromatografia líquida é o nome genérico utilizado para descrever qualquer processo cromatográfico em que a fase móvel seja um líquido e pode ser dividida em [8]:

Cromatografia líquida clássica (CLC): este método utiliza colunas com diâmetros relativamente grandes, empacotadas com fases estacionárias finamente

divididas, pelas quais passam as fases móveis sob ação da gravidade. Separa misturas bastante complexas, porém é um processo demorado [7].

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): utiliza colunas fechadas que contêm partículas muito finas, proporcionando separações mais eficientes. Utiliza altas pressões para forçar a passagem do solvente e assim diminuir o tempo de análise [7].

Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC): o método de operação é igual ao HPLC. No entanto este método permite a análise de partículas de tamanho ainda mais reduzido [7].

3.2. HPLC

É uma técnica avançada da cromatografia líquida tendo vindo a ser cada vez mais empregue ao longo dos anos. A HPLC pode ser definida em dois modos, dependendo da polaridade da fase estacionária: cromatografia de fase normal e cromatografia de fase reversa.

A cromatografia de fase normal é utilizada quando o composto ou analito de interesse é apolar, utilizando uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar. A força de adsorção aumenta à medida que aumenta a polaridade, com consequente aumento do tempo de retenção [12,13].

Relativamente à cromatografia de fase reversa, esta consiste numa fase móvel polar e uma fase estacionária apolar, portanto, é utilizada quando o composto ou analito de interesse é polar pois tem uma maior afinidade com a fase móvel, enquanto os compostos menos polares têm uma maior afinidade com a fase estacionária [12,13].

3.2.1. EQUIPAMENTO

O sistema HPLC possui alguns componentes cruciais para o seu funcionamento: reservatórios que contêm a fase móvel e outros solventes de lavagem, a bomba, um injetor para introduzir a amostra no circuito até à coluna, a coluna de separação e um detetor que monitoriza os analitos e eluentes após a separação da coluna. Muitos equipamentos incluem ainda um forno de coluna que permite regular a temperatura em que ocorre a separação [10]. O sistema é aberto, pelo que para além dos componentes já descritos anteriormente, tem-se ainda um reservatório de admissão de fase móvel e um outro, para recolha de resíduos, já no final do circuito [12,14]. Por norma, o HPLC está ligado a um computador, permitindo assim controlar o sistema e exibir os resultados obtidos. Na figura 2, podem ser observados todos os componentes que integram um sistema HPLC.

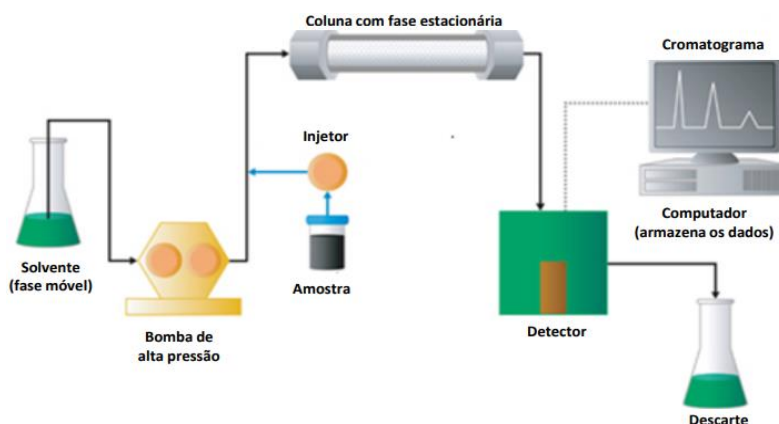


Figura 2: Componentes de um sistema de HPLC [15].

- Bomba

As bombas são as peças de equipamento mais crítica para o sucesso da cromatografia líquida de alta eficiência. O seu desempenho depende fortemente do comportamento do fluxo da mistura de solventes usados como fase móvel. Uma bomba de HPLC moderna deve ter um fluxo contínuo, uma taxa de fluxo com alta precisão e baixo volume morto. Além disso, deve ser possível o controle da pressão máxima do sistema [8].

- Injetor

Para se obter uma boa eficiência em análises cromatográficas, um fator muito importante a considerar é a maneira como se introduz a amostra na coluna. Mesmo a melhor coluna pode resultar numa fraca separação dos componentes se a injeção não for feita cuidadosamente [8]. Por este motivo, é aconselhável a utilização de injetores automáticos.

- Coluna

As colunas cromatográficas são normalmente constituídas por tubos de aço inoxidável. A maioria das colunas possui um comprimento entre 10 e 30 cm e tem 2 a 5 mm de diâmetro interno. O empacotamento destas colunas é feito com partículas com diâmetro entre 3 e 10 μm , podendo estas possuir um formato irregular ou esférico. Por norma, nas colunas utilizadas em HPLC, é inserida na sua parte inicial uma pré-coluna. Esta é uma coluna de comprimento reduzido cuja função é a remoção de impurezas da solução amostra ou fase móvel [10].

- Forno da Coluna

O controlo da temperatura em que ocorre uma separação pode ser relevante dependendo do analito que está a ser analisado. Numa grande maioria das separações, o controlo da temperatura não é crítico para o desempenho de um método, sendo as separações realizadas à temperatura ambiente [16].

O aquecimento de uma coluna pode resultar na diminuição da viscosidade da fase móvel, o que reduz a pressão no sistema permitindo fluxos mais rápidos, reduzindo assim os tempos de retenção. É de notar que sujeitar uma coluna a temperaturas mais elevadas que a temperatura ambiente, pode contribuir para a degradação da coluna, diminuindo a vida útil da mesma [11].

- Detetor

Os dispositivos utilizados para a deteção de sinal numa cromatografia baseiam-se tipicamente nas diferenças das propriedades físicas ou químicas entre o eluente e o analito [8]. De todas as técnicas de deteção aplicadas em HPLC, as mais comuns são: de absorção no ultravioleta (UV) e no visível, de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicas [6]. Apesar de existirem vários tipos de detetores, todos devem possuir características em comum, nomeadamente serem igualmente sensíveis a todos os picos eluídos ou registar apenas aqueles de interesse, não serem afetados por mudanças na temperatura ou na composição da fase móvel, terem a capacidade de controlar as pequenas quantidades de composto, não contribuírem para o alargamento do pico, reagir rapidamente de modo a obter picos estreitos que passam rapidamente pela célula, serem de fácil manipulação, robustos e baratos [8].

3.2.2. VANTAGENS E DESVANTAGENS

A HPLC apresenta várias vantagens, entre as quais se destacam a sua aplicabilidade na quantificação de diversos tipos de analitos, englobando tanto pequenas moléculas orgânicas e iões, como também grandes biomoléculas e polímeros. Apresenta elevada sensibilidade e capacidade de separação, bem como precisão e robustez, que fazem desta técnica uma ferramenta indispensável para o controlo de qualidade em diversas áreas de aplicação [12].

A principal desvantagem associada é o elevado custo, devido à elevada pureza dos reagentes utilizados e ao elevado custo do equipamento e da sua manutenção [12].

3.3. UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)

Atualmente a técnica de UPLC é a mais recente e inovadora técnica de cromatografia líquida. Demonstra ser mais eficiente, devido ao reduzido tamanho de partícula constituinte da fase estacionária, com consequente aumento da área superficial disponível para interação com o analito. Por este motivo, a UPLC promove a melhoria de diversos parâmetros, nomeadamente velocidade, resolução e sensibilidade [12].

4. INTRODUÇÃO TEÓRICA

Os humanos, bem como outros mamíferos têm uma preferência inata por sabores adocicados já que na natureza os primeiros alimentos dos mamíferos, tal como o leite e a fruta, são doces e estão associados a calorias. Na dieta humana, os açúcares ocorrem naturalmente como componentes de diversos alimentos ou são adicionados durante o seu processamento ou preparação. Os açúcares de ocorrência natural como a sacarose, a frutose e a lactose são normalmente encontrados em frutas, legumes e produtos lácticos [17].

4.1. SACAROSE

A sacarose é o carboidrato simples de baixa massa molecular mais abundante. É produzido em larga escala por diversos países, principalmente para usos alimentares, dado que é um alimento natural e amplamente utilizado como ingrediente. Trata-se de um dissacárido formado por dois monossacáridos: D-glicose e D-frutose (figura 3) que fornece 4 kcal/g de energia. Também conhecida por açúcar de mesa ou açúcar comum, pode ser encontrada maioritariamente na cana de açúcar e na beterraba [18].

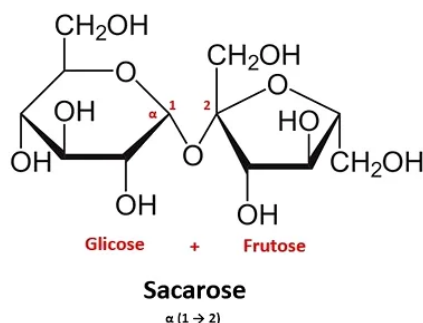


Figura 3: Estrutura Química da Sacarose [18].

Por ser um carboidrato simples de elevado índice glicémico, a sacarose é facilmente digerida pelo organismo, fazendo com que os níveis de glicose aumentem rapidamente na corrente sanguínea (aumento da glicemia), sendo necessário ao organismo produzir mais insulina para a poder transportar para as células. Este fator promove a hipoglicémia no sangue, e consequentemente a fome, de tal forma que se sente necessidade de ingerir mais alimentos, promovendo assim o consumo diário de mais calorias do que aquelas que são aconselhadas [19]. Segundo a Fundação Portuguesa de Cardiologia, cerca de metade da população portuguesa apresenta excesso de peso e perto de um milhão de adultos sofre de obesidade.

Estes números estão, entre outras causas, ligados a hábitos de vida mais sedentários e à transformação dos hábitos alimentares, que tem favorecido o consumo de açúcares e gorduras saturadas [20].

O açúcar apresenta uma variedade de funções na indústria alimentar. Confere aos alimentos doçura, aroma, textura, aumenta o seu tempo de vida útil e ainda melhora a cor. No entanto, existem compostos que possuem características semelhantes à sacarose e, por isso, podem atuar como substitutos desta, preservando o sabor e a textura do alimento, ainda que apresentem menor poder calórico quando comparados com a sacarose [21]. Estes substitutos são denominados por edulcorantes / adoçantes e pertencem ao grupo dos aditivos alimentares.

4.2. ADITIVOS ALIMENTARES

De acordo com o *Codex Alimentarius*, a definição de aditivo alimentar é qualquer substância que não é consumida como sendo um alimento por si só, nem é utilizada como ingrediente, contendo ou não um valor nutritivo, e que é adicionada aos alimentos com o intuito de produzir uma função tecnológica, incluindo alterações nas características organoléticas, na fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, transporte e conservação do alimento [22].

Por outras palavras, os aditivos são substâncias químicas incorporadas nos alimentos processados ou bebidas, com o objetivo de melhorar as características organoléticas e satisfazer as necessidades de produção, processamento, armazenamento e distribuição do produto final.

Os aditivos alimentares podem ter origem natural ou sintética. Os naturais podem ocorrer naturalmente no alimento ou serem recuperados de uma fonte natural, enquanto que os sintéticos são definidos como substâncias artificialmente sintetizadas e constituem a classe de aditivos mais utilizados na indústria devido à sua estabilidade química, fácil aplicação e baixo custo [23].

De acordo com o uso pretendido, os aditivos alimentares podem ser subdivididos em diferentes classes (figura 4) que incluem cerca de 230 compostos diferentes, sendo que os adoçantes apresentam maior relevância para este trabalho [24].

Alguns compostos apresentam mais de uma ação principal (ANEXO 1), devido às suas diferentes funcionalidades, que são dependentes das quantidades adicionadas e do modo de processamento do alimento [25].



Figura 4: Classificação dos aditivos de acordo com as suas características funcionais [24].

4.2.1. ADOÇANTES / EDULCORANTES

Os adoçantes são utilizados para intensificar os níveis de doçura ou até mesmo para incrementar a percepção do sabor doce, levando a uma maior aceitação por parte do consumidor relativamente àquele tipo de produto. Este grupo de aditivos pode ser dividido em 2 subclasses: os artificiais ou não nutritivos e os nutritivos. Os artificiais são frequentemente utilizados como alternativa ao açúcar, são baixos em calorias, devem demonstrar segurança alimentar e conter um sabor residual baixo. Já os adoçantes nutritivos, como é o caso da frutose, isomalte, etc., são baseados em diferentes tipos de carboidratos e têm menos energia que o açúcar, contudo não são isentos de calorias [25].

Quimicamente, os adoçantes ou edulcorantes podem ainda ser divididos em sulfonamidas, péptidos, clorossacáridos e polióis (tabela 1), sendo estes últimos o ponto de partida para o desenvolvimento deste estudo. Tanto as sulfonamidas, como os péptidos e clorossacáridos, estão inseridos no grupo dos edulcorantes não nutritivos. Já os polióis pertencem ao grupo dos nutritivos [26].

Tabela 1 – Características das subclasses dos adoçantes [4,24]

Classe dos Adoçantes	Adoçantes	Exemplos	Teor calórico (kcal/g)	Poder adoçante (sacarose=1)
Não Nutritivos	Sulfonamidas	Acessulfame-k	0	100-200
		Ciclomato	0	30-50
		Sacarina	0	300-550
	Péptidos	Aspartame	4	160-220
	Clorossacáridos	Sucralose	0	400-800
Nutritivos	Polióis	Isomaltitol	2,0	0,45-0,65
		Maltitol	3,0	0,90

Classe dos Adoçantes	Adoçantes	Exemplos	Teor calórico (kcal/g)	Poder adoçante (sacarose=1)
Nutritivos	Polióis	Eritritol	0,2	0,60-0,80
		Lactitol	2,0	0,30-0,40
		Manitol	1,6	0,50-0,70
		Xilitol	2,4	Igual à sacarose
		Sorbitol	2,6	0,50-0,70

Em condições ideais, os adoçantes devem:

- ✓ Possuir um baixo valor calórico;
- ✓ Não provocar efeitos prejudiciais na saúde dos indivíduos;
- ✓ Ter um tempo de vida útil longo;
- ✓ Ser estáveis a temperaturas e pH's numa larga gama de trabalho;
- ✓ Não deixar qualquer sabor residual nas formulações onde são inseridos;
- ✓ Ser bastante solúveis em água e facilmente dissolvidos;
- ✓ Não serem higroscópicos (não devem absorver a água).

4.2.1.1. Adoçantes Não Nutritivos / Artificiais

Os adoçantes não nutritivos, também conhecidos como adoçantes de baixas calorias, artificiais, não-calóricos ou intensos, apresentam um maior poder adoçante do que os adoçantes nutritivos. Assim, para obter o mesmo poder adoçante, a quantidade de açúcares não nutritivos que é necessário adicionar é menor e por isso estes fornecem poucas ou nenhuma calorias [17,27]. Estes adoçantes podem ser encontrados em diversos produtos alimentares, tais como bebidas, gelados, pastilhas elásticas, chocolate, saladas, entre outros [26].

Esta classe de adoçantes tem vindo a ser bastante utilizada na alimentação destinada a diabéticos e para perda de peso. Possui altos níveis de intensidade de doçura, dado que contém níveis muito superiores à sacarose, e um valor calórico pouco relevante. Globalmente existem diversas organizações responsáveis por garantir a segurança dos produtos alimentares, como é o caso da Organização Mundial de Saúde (OMS), que também é responsável por autorizar a utilização destes adoçantes nos alimentos [28].

Segundo a Academia de Nutrição e Dietética (fundada nos Estados Unidos), estes adoçantes podem melhorar o paladar de alguns alimentos que estão inseridos nas dietas e deste modo promover a aceitação desses produtos, aumentando assim o consumo dos mesmos. No entanto, diversos estudos revelaram que o consumo de produtos que continham adoçantes não nutritivos promovia o apetite, chegando-se assim à conclusão de que a sua função na redução da obesidade não estaria a ser cumprida. Um outro exemplo, foi um estudo realizado em crianças e adolescentes, que veio comprovar que havia uma correlação entre o consumo de alimentos que continham adoçantes não nutritivos e o aumento do índice de massa corporal [26].

É necessário ter ainda em atenção que o uso deste tipo de edulcorantes se encontra em debate devido ao facto de ainda estarem a ser discutidas as suas vantagens e desvantagens para a saúde humana. A FDA (*Food and Drug Administration*) não permite, por exemplo, o uso do ciclomato em alimentos, dado já se ter verificado, em diversos estudos animais, que este substituto do açúcar evidenciava capacidade para ser cancerígeno [26].

4.2.1.2. Adoçantes Nutritivos

Os adoçantes nutritivos incluem o açúcar refinado, mel, altos teores de frutose, dextrose e polióis. Como os polióis são o tema principal deste trabalho, são os únicos que serão aprofundados [29].

4.3. POLIÓIS

Os polióis, também designados por açúcares alcoólicos, são compostos químicos que não são considerados nem açúcares nem álcoois, mas sim carboidratos que são provenientes da hidrogenação da sua fonte de açúcar, em que o grupo carbonilo do aldeído ou da cetona é reduzido a um grupo hidroxilo primário ou secundário (figura 5), usando um catalisador de níquel [4,17,29].

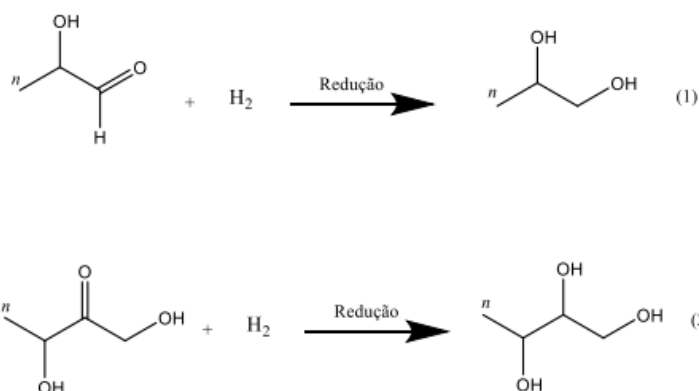


Figura 5: Representação das reações: 1- redução de um aldeído a um grupo hidroxilo primário; 2- redução de uma cetona a um grupo hidroxilo secundário [4].

Os polióis são carboidratos de baixa digestão, ou seja, são absorvidos e digeridos de uma forma incompleta no intestino delgado e são parcialmente fermentados no intestino grosso, pelo que produzem menos energia do que aqueles que possuem uma absorção completa, tal como a sacarose [24]. Podem ter efeitos positivos no que diz respeito à normalização do funcionamento do intestino, mas ainda assim, quando consumidos em excesso, podem levar ao desenvolvimento de sintomas desagradáveis como a diarreia, desconforto abdominal, entre outros [30].

4.3.1. APLICAÇÕES DOS POLÍOIS

Os polióis têm diversas aplicações tanto na indústria alimentar como na farmacêutica, devido às suas propriedades físico-químicas.

Na indústria alimentar, os polióis são utilizados como substitutos da sacarose nas formulações de vários produtos alimentares, tais como em gelados, gomas, produtos de pastelaria e panificação, de forma a garantir que a qualidade e segurança do produto se mantêm. Atuam ainda como agentes de corpo/volume, conferem textura, asseguram a cor, e ainda promovem a diminuição das calorias nos alimentos. Resistem a altas temperaturas de confeção e atribuem aos alimentos uma doçura que pode ir dos 30% aos 90% do poder adoçante da sacarose [26,29].

Ao nível da confeção, a higroscopicidade dos polióis é fundamental. A higroscopicidade está relacionada com a capacidade que estes polióis têm em reter a humidade do ambiente (tabela 2). A maioria é pouco higroscópica, pelo que é uma vantagem no que toca à capacidade de preservar o alimento por mais tempo, pelo facto de não aumentar a atividade da água do mesmo [4].

Também o poder refrescante, avaliado pelo calor de solução (tabela 2) que lhes é característico, possibilita a sua inserção em alimentos que procuram esta condição, proporcionando ao consumidor uma sensação de frescura. A sensação de frescura obtém-se a energias inferiores a -20 kcal/g [4].

Tabela 2 – Higroscopicidade e calor de solução característicos de cada poliol [4]

Polióis	Higroscopicidade	Calor de solução (kcal/g)
Isomaltitol	Baixa	-9
Maltitol	Média	-19
Eritritol	Muito baixa	-43
Lactitol	Baixa	-14
Manitol	Baixa	-29
Xilitol	Média	-36
Sorbitol	Alta	-26

Através da análise da tabela 2, conclui-se que o eritritol é o poliol que proporciona uma maior preservação do alimento (higroscopicidade muito baixa). Já em relação ao poder refrescante, verifica-se que o isomaltitol é que apresenta menor poder, enquanto que o eritritol é o que fornece maior frescura aos alimentos.

Uma outra aplicação importante dos polióis é na alimentação para diabéticos ou em alimentos *light*, dado que estes não exercem qualquer influência nos níveis de insulina no sangue (tabela 3) e possuem um baixo índice calórico [29]. Comparativamente à sacarose, os polióis não são metabolizados ou são pouco metabolizados pelos microrganismos orais, o que previne o aparecimento de cáries [4].

Pode-se então concluir que os polióis contribuem para a prevenção da diabetes, obesidade e cáries.

Tabela 3 – Valores de índice glicémico no sangue, para cada tipo de poliol [29]

Polióis	Índice glicémico no sangue (glicose = 100)
Isomaltitol	9
Maltitol	35
Eritritol	0
Lactitol	6
Manitol	0
Xilitol	13
Sorbitol	9

De todos os polióis referidos até aqui, nos tópicos seguintes serão apenas abordados os de maior interesse para este trabalho, nomeadamente o maltitol, o sorbitol e o xilitol.

4.3.2. MALTITOL

Formação, produção e origem: o maltitol ($C_{12}H_{24}O_{11}$) (figura 6) é um dissacárido produzido comercialmente a partir do amido presente em cereais como o milho, trigo e batata. Resulta da hidrogenação catalítica da D-maltose, originando um composto formado por uma molécula de glicose e uma molécula de sorbitol ligadas entre si. Pode ser encontrado naturalmente em diferentes frutas e vegetais, e ainda no malte torrado e nas folhas de chicória [31].

Características: é o poliol com as características mais semelhantes à sacarose, apesar da higroscopicidade ser diferente, devido à sua alta pureza cristalina e composição química. De todos os polióis, o maltitol é o que tem a solubilidade em água mais próxima à da sacarose: 220 g de sacarose dissolvem-se em 100 mL de água a 37 °C, enquanto que 200 g de maltitol são dissolvidos em 100 mL de água a 37 °C. Possui um poder adoçante que se situa entre os 75% e 90% relativamente à sacarose. Já em relação à viscosidade, também se assemelha à sacarose [31,32].

Sabor: possui um poder refrescante mínimo comparando com os restantes polióis e não atribui qualquer sabor residual. Tem uma doçura semelhante à sacarose [4].

Aplicações: o maltitol pode atuar como agente de volume, emulsionante, estabilizador ou espessante em alimentos e bebidas. Para além de poder substituir o açúcar, também pode substituir gorduras, uma vez que confere aos alimentos uma textura cremosa.

Devido ao facto de ser pouco higroscópico e estável a elevadas temperaturas, o maltitol também pode ser empregue em produtos de panificação, lacticínios, doces e chocolates. Também pode ser utilizado em produtos farmacêuticos e dentífricos [29,31].

Saúde: não provoca cáries. Dada a sua absorção lenta, a resposta da insulina associada à sua ingestão reduz significativamente. Possui baixo poder calórico [29].

Metabolismo: o maltitol é lentamente digerido no intestino delgado, e parte que não foi absorvida é transferida para o cólon onde é fermentada pelas bactérias existentes [29].

Efeitos: um adulto pode ingerir 40 g por dia, enquanto que uma criança apenas 15 g. Quando consumido em excesso, o maltitol pode produzir efeitos indesejáveis como diarreia e desconforto abdominal [4].

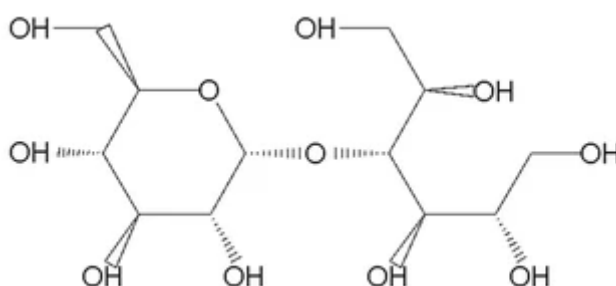


Figura 6: Estrutura química do maltitol [29].

4.3.3. SORBITOL

Formação, produção e origem: o sorbitol ($C_6H_{14}O_6$) (figura 7) é um monossacárido produzido a partir da hidrogenação catalítica da glicose ou da sacarose, que utiliza um catalisador de níquel a elevadas temperaturas [33]. É o poliol mais amplamente encontrado na natureza, principalmente em maçãs, peras, pêssegos e nectarinas, assim como em frutas secas, tâmaras, passas e ainda em alguns vegetais [29,34,35].

Características: possui entre 50% a 70% do poder adoçante da sacarose e cerca de um terço do seu valor calórico [33]. Tanto a higroscopicidade como a solubilidade do sorbitol são elevadas, sendo que a segunda, se deve à fácil formação de pontes de hidrogénio. Pode ser fabricado tanto na forma líquida, como cristalina [29]. É um composto estável, mesmo a altas temperaturas [36].

Sabor: apresenta um sabor doce, e devido ao seu calor de solução ser negativo, dá uma sensação de frescura na boca [29]. Pode ser combinado com outros agentes gelificantes, proteínas e gorduras ou açúcares, aumentando assim a perceção de doçura e promovendo um melhor sabor [4].

Aplicações: além de atuar como adoçante, é também um excelente estabilizante, anti-cristalizante e um agente humectante e de textura [29]. É bastante utilizado na confeção de alimentos dietéticos, doces e gelados.

A indústria farmacêutica também utiliza o sorbitol principalmente nos produtos de higiene, como pasta dentífrica, e como matéria-prima na síntese de ácido ascórbico, propilenoglicol, entre outros [36]. Para além destas aplicações, por ser higroscópico, é muito utilizado em produtos de panificação, pastelaria e chocolates, uma vez que estes produtos têm tendência a secar ou amadurecer durante o seu armazenamento.

Saúde: não promove o aparecimento de cáries, assim como também não influencia os níveis de glicose no sangue [28].

Metabolismo: é lentamente absorvido pelo corpo a partir do trato gastrointestinal, e é metabolizado pelo fígado principalmente como frutose, um carboidrato altamente tolerado por pessoas com diabetes [33].

Efeitos: um consumo superior a 50 g por dia de sorbitol, pode ter como consequências o aparecimento de sintomas como diarreia e desconforto abdominal [28].

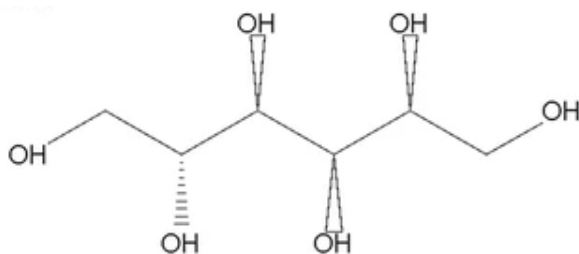


Figura 7: Estrutura química do sorbitol [29].

4.3.4. XILITOL

Formação, produção e origem: o xilitol ($C_5H_{12}O_5$) (figura 8) é um monossacárido que resulta da hidrogenação catalítica do açúcar da madeira (D-xilose), na presença de um catalisador de níquel [37]. Também pode ser produzido biotecnologicamente, com base no seu metabolismo em leveduras [33]. Está presente em muitas frutas e vegetais, bagas, aveia e cogumelos, e é produzido em pequenas quantidades pelo organismo humano [29].

Características: tem uma doçura semelhante à da sacarose, ou seja, é o mais doce de todos os adoçantes nutritivos, ainda que com a vantagem de conter menos de metade das calorias que contém a sacarose [28]. É ligeiramente higroscópico, pouco solúvel em água e estável a altas temperaturas [4].

Sabor: não tem sabor residual, dissolve-se facilmente na boca e é considerado dos polióis que proporciona maior sensação de frescura na boca [29,34].

Aplicações: funciona como agente emulsionante, estabilizante, adoçante e espessante. Pode ser aplicado em pastilhas elásticas, doces e bolachas, mas também em produtos farmacêuticos e nutracêuticos [4,29].

Saúde: não é cariogénico, uma vez que inibe o aparecimento das bactérias responsáveis pelo surgimento das cáries, e aumenta o pH da cavidade oral, promovendo uma remineralização dental. Existem ainda estudos que comprovam que o xilitol pode reduzir a ocorrência de otites em crianças [29].

Metabolismo: da quantidade de xilitol que é ingerida, cerca de 50% é absorvida no intestino delgado, enquanto que 50-70% é fermentada no intestino grosso [4].

Efeitos: o organismo humano é capaz de tolerar 100 g por dia deste poliál. Caso esta quantidade seja excedida podem ser sentidos efeitos gastrointestinais indesejáveis como diarreia, e em casos mais graves, pode provocar síndrome do intestino irritável. Durante a fermentação do xilitol são ainda produzidos gases que podem causar inchaço e flatulência [4,38].

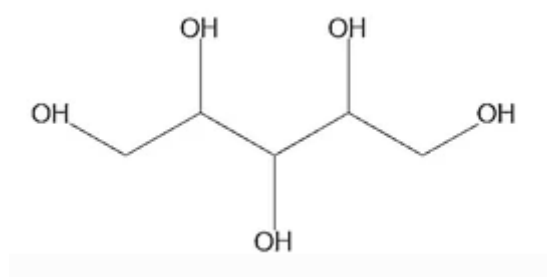


Figura 8: Estrutura química do xilitol [29].

5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Hoje em dia, é cada vez mais exigida e reconhecida a necessidade de evidenciar a qualidade de um método de ensaio analítico. Para tal, o método é submetido a uma avaliação denominada de validação. A validação tem como objetivo demonstrar, através de estudos laboratoriais, que o método é adequado aos requisitos exigidos pela aplicação analítica pretendida, ou seja, o processo de validação pretende demonstrar que o método é adequado para a quantificação de determinado analito numa amostra, a um certo nível de concentração, com exatidão e precisão satisfatórias. A validação é importante, não só para os laboratórios ou instituições, como para os clientes destes, pelo que é fundamental saber selecionar o método que melhor se adapta a cada análise e que assegure a validade dos resultados [6,9,39].

A validação de um método é um processo contínuo, que começa no planeamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e implantação. Quando o método envolve técnicas cromatográficas, a validação inclui a execução e interpretação de uma série de ensaios planeados com o objetivo de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, deteção e avaliação dos dados [6].

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação indireta e por avaliação direta. A avaliação indireta é realizada por determinação e evidência dos seus parâmetros característicos. Por outro lado, a avaliação direta é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro, quer isto dizer, visa essencialmente conhecer a exatidão [40].

5.1. AVALIAÇÃO INDIRETA

Os parâmetros que são analisados por avaliação indireta são:

- Especificidade / Seletividade
- Quantificação
- Precisão

5.1.1. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Diz-se que um método é específico quando permite distinguir o analito de outras substâncias que possam estar presentes na amostra, ou seja, quando garante que a grandeza medida diz apenas respeito ao analito [39].

A seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa, sem interferência de outros componentes [9,40].

De forma sucinta, a especificidade refere-se a um método específico para um único analito e a seletividade refere-se a um método utilizado para vários analitos, com capacidade de distinção entre eles [7].

5.1.2. QUANTIFICAÇÃO

A quantificação é importante para interpretar os resultados obtidos em cada ensaio. Para tal, é necessário calcular vários parâmetros, entre os quais se destacam:

- Curvas de Calibração
- Gama de trabalho
- Linearidade
- Sensibilidade
- Limiares Analíticos

- Curvas de Calibração

A curva ou reta de calibração é útil em análises quantitativas, uma vez que permite correlacionar uma concentração de analito conhecida, com a resposta dada pelo método. Para isso, é necessário realizar uma série de soluções padrão com concentração conhecida, que são analisadas nas mesmas condições que as amostras. Obtém-se então uma curva de calibração, onde o sinal analítico (y) está representado em função da concentração (x) [4]. A partir desta curva, é possível determinar a concentração do analito, através da equação 1.

A reta de calibração está na forma de $y = mx + b$.

$$C_{\text{analito}} = \frac{y - b}{m} \quad (1)$$

sendo y o sinal analítico, b a ordenada na origem e m o declive corresponde da reta.

Para avaliar a calibração analítica, pode ser usado o coeficiente de correlação linear (r), calculado com base na equação 2 [4,40].

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x})^2\} \times \sum_{i=1}^N \{(y_i - \bar{y})^2\}}} \quad (2)$$

onde N é o número de pontos da reta de calibração ($N \geq 5$), $\bar{x}$ e $\bar{y}$ correspondem à média dos valores de x (concentração dos padrões) e de y (sinal analítico), respetivamente.

Deste modo, o r estabelece a relação que existe entre o sinal analítico medido e a concentração do padrão [4,9].

O valor de r pode variar entre $-1 \leq r \leq 1$, sendo que para efeitos de validação de métodos, o seu valor deve ser superior a 0,995 [40].

- Gama de Trabalho

A gama de trabalho ou gama analítica, corresponde ao intervalo de concentrações a partir do qual é possível determinar o analito com uma boa linearidade, precisão e exatidão, e é expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico [41].

A gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade das variâncias, segundo o qual o número de padrões para a calibração deve ser superior a cinco. No teste da homogeneidade das variâncias, tanto o primeiro como o último padrão, são analisados em 10 réplicas independentes, para de seguida serem calculadas as suas variâncias (S_1^2 e S_n^2) (equação 3) [40].

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{N_i - 1} \quad (3)$$

Com:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{ij}}{N_i} \quad (4)$$

sendo i – número do padrão, N_i – número de repetições efetuadas e j – valor obtido em cada repetição.

As variâncias são testadas para examinar se existem diferenças significativas nos limites da gama de trabalho, através do cálculo do valor teste, TV:

$$a) \quad TV = \frac{S_n^2}{S_1^2} \quad (5), \text{ se } S_n^2 > S_1^2$$

$$b) \quad TV = \frac{S_1^2}{S_n^2} \quad (6), \text{ se } S_1^2 > S_n^2$$

O valor calculado deve seguir uma distribuição de Fisher, sendo que o numerador deve conter os mesmos ou mais graus de liberdade do que o denominador [7]. Por fim, compara-se este valor com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor / Fisher* (ANEXO 2), para n-1 graus de liberdade:

➤ Se $TV \leq F$: as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada;

➤ Se $TV > F$: as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao 1º e último padrão permitam obter $TV \leq F$ [40].

- Linearidade

A linearidade é a capacidade que o método analítico tem de fornecer um sinal diretamente proporcional à concentração do analito, dentro do intervalo da gama de trabalho [9,41].

Um dos parâmetros que pode ser usado para avaliar a linearidade é o coeficiente de determinação (r^2), que traduz a adequabilidade de um modelo linear aos valores experimentais, sendo que deve assumir valores superiores 0,98 [9,42]. No entanto, este coeficiente apenas é bom indicador de correlação, mas não necessariamente de linearidade, pelo que não deve ser analisado isoladamente. Segundo a norma 8466-1 [43], o teste de *RIKILT* é um teste complementar ao coeficiente de correlação, que permite avaliar de forma mais fiável a linearidade [8,41].

O teste de *RIKILT* permite analisar a linearidade em cada ponto da reta. Como tal, determina-se a razão entre cada sinal instrumental y_i e a concentração respetiva x_i , bem como a média das razões obtidas: $m\left(\frac{x_i}{y_i}\right)$. O valor da média deverá ser considerado como 100% (linearidade perfeita), e cada ponto da reta deverá estar entre os 90% e 110%. Caso algum ponto não verifique este requisito, é excluído e o teste de *RIKILT* deve ser novamente aplicado à gama reduzida [8,41]. A equação 7 representa a equação a ser utilizada no teste:

$$\left(\frac{\frac{y_i}{x_i}}{\left(\frac{y_i}{x_i}\right)_m} \right) \times 100\% \quad (7)$$

- Sensibilidade (S)

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com elevado nível de confiança, pequenas variações na concentração do analito [44]. Corresponde à derivada de primeira ordem da curva de calibração na zona de concentração definida. Caso a curva seja definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive (m) dessa reta de calibração [9]:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta x} = m \quad (8)$$

sendo que Δy corresponde ao valor lido pelo método e Δx às pequenas variações de concentração.

Pode-se então concluir que em modelos lineares, a sensibilidade do método está relacionada com o declive da reta, ou seja, quanto maior for o declive, mais sensível é o método.

A sensibilidade tem bastante interesse pelo seu aspeto relativo, ou seja, quando se pretende averiguar a sua evolução ao longo do tempo ou quando se pretende compará-la entre métodos analíticos, baseados em modelos lineares, para o mesmo analito ou ainda quando se compara a sensibilidade para vários analitos [8].

É ainda de salientar que o termo sensibilidade encontra-se associado à capacidade de resposta do analito e não deve ser confundido com o limite de deteção, que corresponde à menor concentração do analito que pode ser detetada, e que será abordado mais à frente [9].

- Desvio-padrão do método (S_m)

O desvio-padrão do método (equação 9) permite perceber a qualidade do trabalho realizado. Este desvio padrão é determinado com base nos valores do desvio-padrão residual ($S_{y/x}$) (equação 10), que exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração, e no declive das retas de calibração [4,40]:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{m} \quad (9)$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} (y_i - y_x)^2}{N - 1}} \quad (10)$$

em que y_i são os valores individuais do sinal instrumental obtido, y_x são os valores do sinal previstos pela reta de calibração, N é o número de pontos da reta e m corresponde ao declive.

O desvio-padrão relativo do método (DP) é determinado da seguinte forma:

$$DP \% = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100\% \quad (11)$$

onde $\bar{x}$ corresponde à média dos valores de concentração da solução padrão, utilizados para a construção da reta de calibração. Por norma, os valores de DP devem ser inferiores a 10%.

- Limiares analíticos

Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção pode ser definido como o teor mínimo, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável (normalmente 95%). Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato. Uma leitura inferior ao LD não significa que o analito não esteja presente na amostra, apenas que a sua concentração é inferior a um determinado valor [40].

Quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear, o limite de detecção é calculado através do desvio padrão-residual da curva de calibração, de acordo com a seguinte equação [40]:

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \quad (12)$$

Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação corresponde à menor concentração na qual é possível quantificar o analito com uma certa precisão e exatidão. Normalmente o LQ corresponde ao padrão de calibração de menor concentração [4]. Este parâmetro pode ser determinado da seguinte forma:

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m} \quad (13)$$

Segundo as recomendações IUPAC, após a sua determinação este deve ser testado de modo a averiguar se a exatidão e precisão conseguidas são satisfatórias.

5.1.3. PRECISÃO

A precisão tem como objetivo avaliar a dispersão dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra (duplicados), amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas [9,40].

Existem duas medidas extremas para avaliar essa dispersão: repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia ou variabilidade laboratorial [40].

Geralmente, a precisão é expressa sob a forma de desvio-padrão (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (14)$$

ou pelo coeficiente de variação (CV):

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (15)$$

Sendo que s corresponde ao desvio padrão da precisão e $\bar{x}$ à média dos resultados obtidos. Por norma, em métodos de análise, aceitam-se valores de CV até 10%. Quer a repetibilidade, quer a reprodutibilidade dependem, geralmente, da concentração de analito, por isso devem ser determinadas para um diferente número de concentrações [6,9].

- Repetibilidade

A repetibilidade avalia a dispersão dos resultados de medições sucessivas que usam o mesmo método sob as mesmas condições de medição, isto é, usam o mesmo procedimento, realizado pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento e usando as mesmas condições experimentais. Quer isto dizer que a repetibilidade é o desvio padrão associado à média dos resultados obtidos no método [6]. A determinação da repetibilidade exige no mínimo 10 ensaios.

O limite de repetibilidade (Δr) é definido como o valor máximo permitido para a diferença entre dois ensaios obtidos em condições de repetibilidade, com um intervalo de confiança de 95% e é calculado com base na equação 16 [9,40]:

$$\Delta r = t_{0,05(n-1)}^u \times \sqrt{2} \times S_{ri} \quad (16)$$

onde n é o número de réplicas que servem de base para determinar o desvio-padrão, S_{ri} , referente à repetibilidade estimada, e $t_{0,05(n-1)}^u$ o valor crítico da distribuição *t-student* (ANEXO 3), com um nível de significância de 0,05 e com $n-1$ graus de liberdade.

Se a amplitude entre dois ensaios for superior ao limite de repetibilidade, deve ser feita uma análise crítica e, se necessário, recorrer à repetição de ensaios segundo um plano assente em dados bibliográficos ou normas [9].

O coeficiente de variação de repetibilidade, CV_r , também deve ser considerado, e é numericamente igual à razão entre o desvio-padrão da repetibilidade, S_{ri} , e a média dos resultados obtidos, $\bar{x}$:

$$CV_r (\%) = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (17)$$

- Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo procedimento numa mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição tais como [40]:

- ✓ diferentes laboratórios;
- ✓ diferentes operadores;
- ✓ diferentes equipamentos;
- ✓ e/ou intervalo temporal diferente.

O limite de reprodutibilidade (ΔR) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas [40].

$$\Delta R = t_{0,05(n-1)}^u \times \sqrt{2} \times S_{Ri} \quad (18)$$

Também é importante considerar o coeficiente de variação de reprodutibilidade, CV_R , que é numericamente igual à razão entre o desvio-padrão da reprodutibilidade, S_{Ri} , e a média dos resultados obtidos, $\bar{x}$. Este pode ser determinado segundo a equação:

$$CV_R (\%) = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (19)$$

Quando o objetivo passa pela implementação de um novo método de análise, o estudo da reprodutibilidade de um método é imprescindível, uma vez que é necessário investigar a precisão do método sobre diferentes condições. O mesmo não tem tanta importância na validação de um método num só laboratório de análises, uma vez que a

intenção passa por executar o método nesse mesmo laboratório, dando uso aos mesmos equipamentos, com condições que variam pouco ao longo do tempo [9].

- Precisão Intermédia

A precisão intermédia exprime a precisão estimada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente qual ou quais as condições a variar, nomeadamente diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias, sendo que para esta última se aconselham no mínimo dois dias de diferença entre cada análise [7,40].

Esta medida de precisão é considerada a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar. Segundo a norma ISO 5725:3 [45], a precisão intermédia pode ser avaliada de três formas distintas: através de cartas de controlo de amplitudes aplicadas a réplicas, a duplicados da amostra e a padrões, quando se realizam n ensaios sobre t amostras ou padrões, ou quando se realizam n medições sobre uma mesma amostra, amostras supostamente idênticas ou o mesmo padrão. De acordo com esta norma o método considera-se preciso em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação (equação 20) for inferior a 5,0% [40].

$$CP_i (\%) = \frac{S_{Pi}}{\bar{X}} \times 100 \quad (20)$$

5.2. AVALIAÇÃO DIRETA

A avaliação direta tem como objetivo determinar a exatidão dos métodos de ensaio. A exatidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro [4,40].

A exatidão do método deve ser determinada após ser estabelecida a linearidade, gama de trabalho e especificidade do mesmo, sendo que deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, ou seja, três concentrações distintas (baixa, média e alta) dentro da gama de trabalho, com no mínimo três réplicas cada [7]. É importante referir que uma boa exatidão nem sempre é sinónima de uma boa precisão, tal como se pode constatar na figura 9 [39].

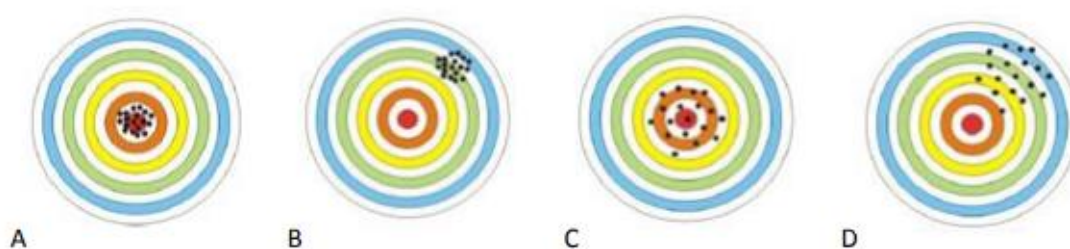


Figura 9: Esquema representativo da relação entre a exatidão e a precisão: **A)** boa exatidão e boa precisão, **B)** má exatidão, mas boa precisão, **C)** boa exatidão, mas má precisão e **D)** má exatidão e má precisão [39].

Os processos mais utilizados para avaliar este parâmetro são: materiais de referência certificados (MRC), ensaios interlaboratoriais, testes comparativos e ensaios de recuperação, sendo que apenas o último será usado para a análise da exatidão [4].

5.2.1. MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS (MRC)

Os materiais de referência certificados são utilizados no processo de validação de um método de ensaio, de forma a avaliar o desempenho do laboratório, por isso, o fornecimento de MRC é realizado por entidades reconhecidas e de confiança, como por exemplo o NIST (*National Institute of Standards and Technology*, dos Estados Unidos da América) [7].

Na avaliação da exatidão através de um material de referência, os valores médios obtidos pelo laboratório e o desvio-padrão de uma série de ensaios em duplicado, devem ser comparados com os valores certificados do material. Existem diversos parâmetros utilizados para fazer a comparação dos valores obtidos, entre os quais se destacam [7]:

- ✓ Erro Relativo (ER);
 - ✓ Fator de Desempenho Z (*Z-Score*);
 - ✓ Erro Normalizado (En).
-
- Erro Relativo (ER)

O erro relativo revela a componente dos erros sistemáticos do laboratório, sendo o próprio laboratório quem estabelece o grau de exigência relativo à exatidão para o método estudado, com base em dados bibliográficos. O ER pode ser calculado através da seguinte expressão [40]:

$$ER = \frac{X_{lab} - X_V}{X_V} \times 100\% \quad (21)$$

onde X_{lab} é o valor obtido experimentalmente ou a média aritmética dos valores obtidos e X_V o valor considerado como verdadeiro.

- Fator de Desempenho ("*Z-Score*")

O laboratório pode também optar por verificar o seu desempenho na análise do MRC, através do cálculo do fator de desempenho (equação 22) [40]:

$$Z = \frac{X_{lab} - X_V}{s} \times 100\% \quad (22)$$

sendo X_{lab} o valor obtido pelo laboratório, X_V o valor aceite como verdadeiro para o MRC, e s a unidade de desvio, que poderá ser a incerteza do MRC ou outra unidade de desvio interna.

A avaliação do desempenho pode ser feita de acordo com a seguinte escala [40]:

$|Z| \leq 2$: satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$: questionável

$|Z| > 3$: incorreto

- Erro Normalizado (En)

Caso o laboratório calcule a incerteza do seu resultado (U_{lab}), o valor verdadeiro (X_V) deve estar dentro do intervalo de incerteza de X_{lab} . Quando tal não acontece, este intervalo poderá ser subestimado. Nestes casos, é geralmente empregue o conceito de erro normalizado (En) (equação 23) para efetuar a avaliação do desempenho [40]:

$$En = \frac{(X_{lab} - X_V)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (23)$$

sendo que U_{ref}^2 é a incerteza associada ao valor verdadeiro.

Se $|En| \leq 1$, então U_{lab} está bem estimada.

5.2.2. ENSAIOS INTERLABORATORIAS

Os ensaios interlaboratoriais são importantes quando um laboratório pretende ser acreditado, avaliando desse modo a sua exatidão ou quando pretende avaliar as características do método, no que diz respeito aos parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade. Por este motivo, está igualmente a demonstrar que possui uma precisão semelhante aos outros laboratórios, num estudo em concreto [4].

5.2.3. TESTES COMPARATIVOS

Na avaliação de um método interno, a aplicação de testes comparativos é uma mais-valia, para além de uma opção mais económica, uma vez que permite estabelecer a comparação entre os resultados obtidos por esse mesmo método e os resultados de um método considerado como referência. Este tipo de ensaio comparativo pretende essencialmente realizar o estudo da proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, ou seja, avaliar a exatidão do método interno face ao método de referência. Em termos práticos, usando os dois métodos de ensaio em separado sobre as mesmas amostras, são realizadas análises em replicado. Esta comparação pode ser feita tanto numa gama restrita de concentrações como em toda a gama de concentrações na qual se pretende validar o método [9].

5.2.4. ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Os ensaios de recuperação permitem avaliar a exatidão sem recorrer a materiais certificados, o que é uma grande vantagem económica para o laboratório, usando apenas soluções de padrão e amostras.

Inicialmente a amostra é analisada sem qualquer fortificação, através de ensaios em duplicado, e de seguida, é fortificada com uma determinada quantidade de padrão, de concentração conhecida.

A taxa de recuperação (R) (equação 24), resulta da comparação entre a quantidade exata de padrão que foi adicionada à amostra, e o valor experimental obtido pela metodologia. O valor da taxa de recuperação deve ser próximo dos 100% para que o método seja considerado apto [4]. No laboratório, foi estabelecido internamente que o intervalo aceite para as taxas de recuperação seria entre 80% e 120%.

$$R (\%) = \frac{C_{\text{obtida}} - C_{\text{inicial}}}{C_{\text{fortificação}}} \times 100 \quad (24)$$

$$C_{\text{fortificação}} = \frac{C_{\text{SP}} \times V_{\text{adicionado}}}{V_{\text{diluição}}} \quad (25)$$

Sendo que a C_{obtida} se trata da concentração final de analito na amostra após a fortificação e a C_{inicial} indica a concentração da amostra para o respetivo analito, antes da fortificação. C_{SP} representa a concentração da solução padrão de maior concentração, $V_{\text{adicionado}}$ é o volume adicionado da solução padrão de maior concentração e $V_{\text{diluição}}$ corresponde ao volume final da amostra após diluição.

Se as taxas de recuperação estiverem compreendidas entre 80% e 120%, o método é considerado exato.

6. SECÇÃO EXPERIMENTAL

Nesta secção enumeram-se os reagentes, materiais e equipamentos necessários à realização deste trabalho, bem como a descrição do procedimento realizado.

6.1. REAGENTES

Os reagentes utilizados foram: acetona e água para HPLC adquiridos na *Honeywell* e *VWR*, respetivamente; padrão de sorbitol de grau analítico para HPLC adquirido na *VWR*; padrão de grau analítico de xilitol adquirido na *TCI* e padrão de maltitol de grau analítico adquirido na *Alfa Aesar*.

6.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- ✓ Trituradora
- ✓ *Erlenmeyers* (*VWR*; *Normax*)
- ✓ Balança analítica (*VWR* $\pm 0,0001$ g)
- ✓ Banho de água (*Velp Scientifica*)
- ✓ Balões Volumétricos (*Normax*)
- ✓ Centrífuga (*Hettich Zentrifugen*)
- ✓ Tubos *falcon* (*Normax*)
- ✓ Micropipetas (*Normax*; *Eppendorf*)
- ✓ Pontas para micropipetas (*Eppendorf*)
- ✓ Ultrassons (*Bandelin Sonorex Super*)
- ✓ Magnetes
- ✓ Seringas 5 mL (*Henke-Ject*)
- ✓ Filtros Seringa 0,45 μm (*Pall corporation*)
- ✓ *Vials* (*Alwsci Technologies*)
- ✓ Equipamento HPLC com detetor de índice de refração (*Agilent Technologies 1260 Infinity*)
- ✓ Coluna para HPLC (*XBridge Amide 3.5 μm*)

6.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.3.1. PREPARAÇÃO DA FASE MÓVEL

A fase móvel utilizada é constituída por acetona e água ultrapura para HPLC numa razão de 80:20 (v/v). De seguida são adicionados 1,5mL de trietilamina.

6.3.2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO-MÃE PADRÃO (5% m/v)

Pesar rigorosamente 2,5g de cada poliol (sorbitol, xilitol e maltitol) num balão volumétrico de 50 mL. Perfazer o volume com água ultrapura e colocar o balão no aparelho de ultrassons até dissolver.

6.3.3. PREPARAÇÃO DOS PADRÕES PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO

Preparar 6 soluções padrão: padrão 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com concentração de 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 2,00 e 3,00%, respetivamente e de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 4 – Volumes a pipetar da solução-mãe padrão para a construção da curva de calibração

Concentração Final (%)	Volume a pipetar da solução-mãe 5% (mL)	Volume Final (mL)
0,05	1	100
0,10	2	100
0,50	5	50
1,00	5	25
2,00	10	25
3,00	15	25

6.3.4. MATRIZ ALIMENTAR

Para a validação do método em questão, é necessário utilizar uma matriz alimentar que contenha na sua formulação polióis. Neste caso, foi escolhida uma tablete de chocolate negro sem açúcar, uma vez que se suspeitava que o açúcar tivesse sido substituído por polióis.

6.3.5. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Pesar 5 g de uma amostra representativa devidamente homogeneizada para um *erlenmeyer*. Adicionar 50 mL de água ultrapura à amostra e colocar num banho a 60 °C durante 25 min. Centrifugar e filtrar com filtro seringa de 0,45 µm para *vials*. A amostra deve ser analisada no HPLC logo após a preparação.

6.3.6. ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Tal como referido no ponto 5.2.4, os ensaios de recuperação consistem em adicionar à amostra uma quantidade conhecida de padrão, que é posteriormente comparada com o valor experimental obtido pela metodologia. Sabendo a concentração inicial da solução-mãe padrão (5%), a concentração final de padrão para fortificação da amostra (qualquer valor dentro da gama de trabalho), e o volume final pretendido (50mL), é possível determinar qual o volume inicial de solução-mãe a adicionar à amostra.

Este volume é calculado segundo a equação 26:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \quad (26)$$

6.3.7. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas usadas para a validação do método foram as seguintes:

- ✓ Volume de injeção: 10µL
- ✓ Fluxo: 0,5mL/min
- ✓ Temperatura do forno da coluna: 55°C
- ✓ Tempo de corrida: 20min
- ✓ Detecção: RID

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos para a validação do método dos polióis, bem como a sua consequente interpretação.

7.1. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Os parâmetros de especificidade e seletividade permitem determinar a existência de possíveis interferências e a sua influência nos resultados obtidos.

7.1.1. ESPECIFICIDADE

A especificidade do método foi avaliada para demonstrar que o método é capaz de avaliar inequivocamente cada um dos compostos de interesse. Este estudo foi realizado injetando cada composto de forma individual e em diferentes concentrações.

- Xilitol

Foram preparadas três soluções contendo xilitol com concentrações distintas: 0,05%; 0,50% e 3,00% (nível baixo, médio e alto). Para cada uma destas soluções foi registado o tempo de retenção (t_r), bem como as áreas dos picos e os respetivos cromatogramas obtidos (ANEXO 4).

Tabela 5 – Tempos de retenção e áreas de pico obtidos para o xilitol

	t_r (min)	Área do pico
Padrão 1 (0,05%)	6,464	1 193 565,4
Padrão 3 (0,50%)	6,599	1 992 732,9
Padrão 6 (3,00%)	6,628	6 617 764,0

Através da análise da tabela 5 é possível verificar que a variação da concentração de analito não tem influência no seu tempo de retenção, apenas se regista um aumento da intensidade do pico (área), uma vez que esta é proporcional à concentração de analito. Pode então concluir-se que o método é específico para o xilitol.

- Sorbitol

Assim como para o xilitol, para o sorbitol também foram preparadas as mesmas três soluções, alterando apenas o analito em estudo. Os dados referentes ao sorbitol foram registados na tabela 6 e os seus cromatogramas encontram-se no ANEXO 5.

Tabela 6 – Tempos de retenção e áreas de pico obtidos para o sorbitol

	tr (min)	Área do pico
Padrão 1 (0,05%)	7,624	255 440,1
Padrão 3 (0,50%)	7,745	1 092 240,3
Padrão 6 (3,00%)	7,783	5 499 489,5

Tendo em conta os resultados obtidos para o sorbitol pode-se concluir que o método escolhido é específico para este analito, uma vez que o tempo de retenção permanece quase inalterado, independentemente da concentração. Já a área do pico aumenta ao longo da gama de trabalho, tal como era de esperar.

- Maltitol

O último analito em estudo era o maltitol. Também para este foram preparadas três soluções de concentração distinta, com o objetivo de avaliar qual o impacto da variação da concentração nos tempos de retenção e áreas de pico. Os cromatogramas obtidos encontram-se no ANEXO 6 e os restantes dados estão representados na tabela 7.

Tabela 7 – Tempos de retenção e áreas de pico obtidos para o maltitol

	tr (min)	Área do pico
Padrão 1 (0,05%)	13,106	65 211
Padrão 3 (0,50%)	13,125	859 410,9
Padrão 6 (3,00%)	13,251	5 284 417,5

Tal como para os analitos anteriores, também para o maltitol se concluiu que o método era específico, uma vez que não se registou impacto no seu tempo de retenção, com a variação da concentração. Verificou-se ainda um aumento da intensidade dos picos, uma vez que aumentando a concentração da solução, a área do pico aumenta consequentemente.

7.1.2. SELETIVIDADE

Uma vez que se demonstrou que a variação da concentração não tem influência no tempo de retenção dos analitos, a seletividade do método foi demonstrada pela injeção de seis soluções (padrões de calibração) contendo os três analitos juntos, em concentrações distintas. A figura 10 ilustra um dos cromatogramas obtidos, neste caso, para o padrão 6 (3,00%), que é o padrão de maior concentração, logo é mais fácil de observar os picos obtidos.

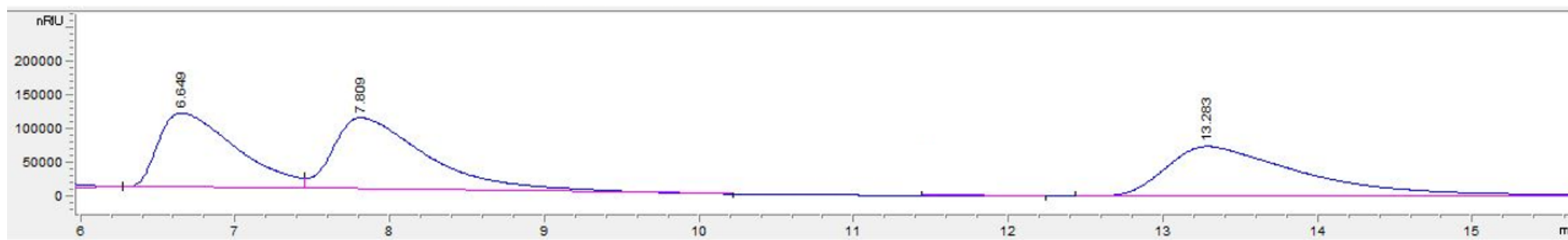


Figura 10: Cromatograma obtido para o padrão 6.

Ao comparar os tempos de retenção dos analitos obtidos no padrão 6, com os tempos de retenção obtidos para cada um de forma individual (tabelas 5 a 7), não se verificam alterações significativas. Por este motivo, pode-se concluir que para além de específico, o método também demonstrou ser seletivo para os polióis em estudo, visto que ao injetar soluções que contenham os três em simultâneo, o método é capaz de os separar e distinguir, sem afetar o seu tempo de retenção.

7.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO E LINEARIDADE

Este método utiliza uma curva de calibração na qual estão representados os vários padrões escolhidos, e através da qual podemos conhecer a quantidade de polióis presentes na amostra de chocolate em estudo.

Os padrões são referências muito importantes na validação de qualquer método analítico, logo não devem ser removidos de uma curva de calibração sem fundamento estatístico, pois a gama de trabalho do método pode ficar afetada.

Para avaliar a linearidade da calibração analítica, foi analisado o r^2 de todas as curvas de calibração traçadas para cada poliol ao longo de todo o período de estágio, e de seguida submeteu-se uma delas ao teste de RIKILT para comprovar de facto a linearidade, através do estudo dos resíduos.

- Xilitol

Na tabela 8, encontram-se representadas as equações das retas obtidas para cada curva de calibração do xilitol, bem como os coeficientes de determinação associados.

Tabela 8 – Listagem das diferentes equações da reta e coeficientes de determinação, obtidos nos diferentes dias de trabalho, relativos ao xilitol

Equações da Reta	r^2
$y = 1E+06x + 907\ 057$	0,9979
$y = 1E+06x + 964\ 684$	0,9976
$y = 822455x + 9\ 884$	0,9988
$y = 1E+06x - 13\ 299$	0,9994
$y = 2E+06x + 58\ 295$	0,9979
$y = 2E+06x + 126\ 158$	0,9982
$y = 2E+06x + 96\ 670$	0,9984
$y = 2E+06x + 22\ 272$	0,9987

Com base na tabela 8 é possível concluir que o modelo linear é adequado aos valores experimentais obtidos para o xilitol, uma vez que todos os coeficientes de determinação são superiores a 0,98.

Das várias curvas de calibração traçadas para o xilitol, submeteu-se uma delas, representada graficamente na figura 11, ao teste de RIKILT, cujos resultados do mesmo foram registados na tabela 9.

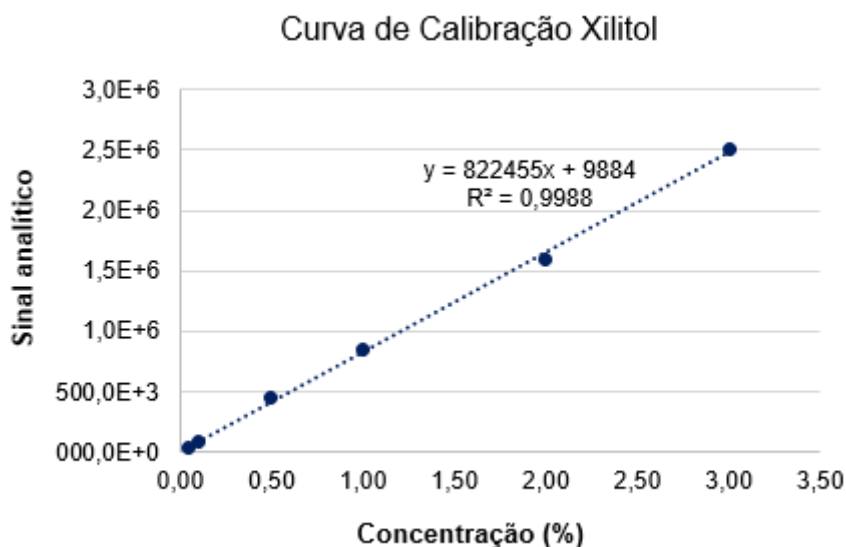


Figura 11: Representação gráfica de uma curva de calibração obtida para o xilitol.

Tabela 9 – Avaliação da linearidade da reta de calibração do xilitol através do teste de RIKILT

X_i	Y_i	$\frac{Y_i}{X_i}$	$\frac{\frac{Y_i}{X_i}}{m(\frac{Y_i}{X_i})} \times 100\%$
0,0500	37 875,90	757 366,5267	91,38
0,1000	82 364,90	823 484,3031	99,36
0,5001	453 845,60	907 509,6981	109,50
1,0002	852 869,90	852 699,3601	102,88
2,0004	1 599 888,10	799 784,0932	96,50
3,0006	2 502 881,80	834 127,1079	100,64

A partir da tabela 9, é possível verificar que todos os pontos da reta de calibração se encontram no intervalo entre 90 e 110%, confirmando assim a linearidade do método para o xilitol.

- Sorbitol

A tabela 10 é referente às equações das retas obtidas para o sorbitol e aos coeficientes de determinação registrados para cada uma.

Tabela 10 – Listagem das diferentes equações da reta e coeficientes de determinação, obtidos nos diferentes dias de trabalho, relativos ao sorbitol

Equações da Reta	r^2
$y = 2E+06x + 246\,895$	0,9971
$y = 2E+06x + 401\,718$	0,9989
$y = 2E+06x - 110\,096$	0,9990
$y = 2E+06x - 115\,155$	0,9976
$y = 2E+06x - 58\,216$	0,9978
$y = 2E+06x + 75\,881$	0,9994
$y = 2E+06x + 37\,490$	0,9975
$y = 2E+06x + 4\,636,8$	0,9986

Todos os coeficientes de determinação registraram um valor acima de 0,98; pelo que se pode concluir que existe uma boa correlação entre os valores obtidos pelo método.

Uma das curvas de calibração determinadas para o sorbitol (figura 12) foi testada pelo teste de RIKILT, registrando-se de seguida os resultados do teste na tabela 11.

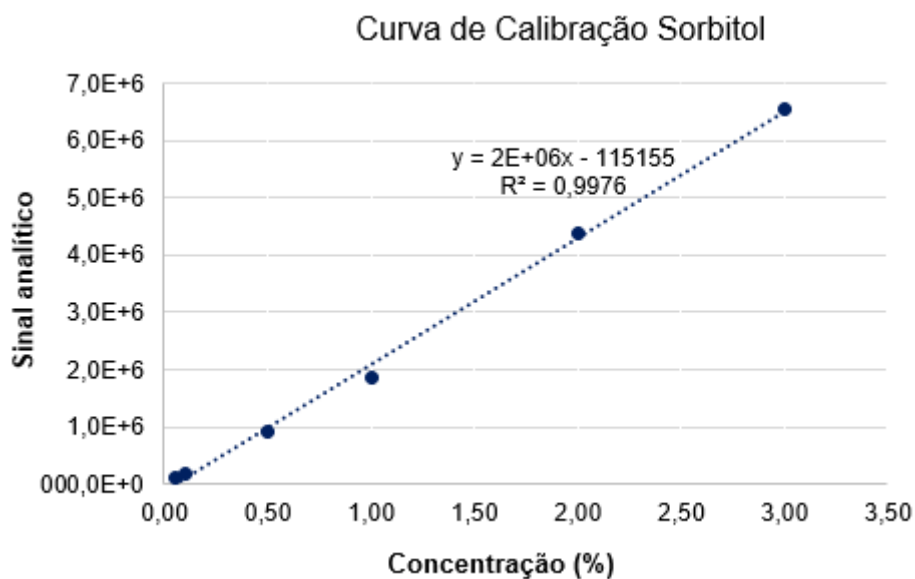


Figura 12: Representação gráfica de uma curva de calibração obtida para o sorbitol.

Tabela 11 – Avaliação da linearidade da reta de calibração do sorbitol através do teste de RIKILT

X_i	Y_i	$\frac{Y_i}{X_i}$	$\frac{\frac{Y_i}{X_i}}{m(\frac{Y_i}{X_i})} \times 100\%$
0,0500	105 034,10	2 100 429,948	104,13
0,1000	193 392,60	1 933 693,957	95,87
0,5001	920 199,90	1 840 178,979	91,23
1,0001	1 876 485,40	1 876 260,249	93,02
2,0002	4 372 888,00	2 186 181,658	108,38
3,0004	6 539 660,00	2 179 625,112	108,06

Tendo em conta os resultados registados da tabela 11, confirma-se que todos os pontos da reta de calibração estão dentro do intervalo aceitável pelo teste de RIKILT, logo o método também é linear para o sorbitol.

- Maltitol

As equações das retas obtidas para o maltitol, assim como os seus coeficientes de determinação encontram-se registados na tabela 12.

Tabela 12 – Listagem das diferentes equações da reta e coeficientes de determinação, obtidos nos diferentes dias de trabalho, relativos ao maltitol

Equações da Reta	r^2
$y = 2E+06x + 50\ 056$	0,9972
$y = 2E+06x - 8\ 042,8$	1,0000
$y = 2E+06x - 20\ 869$	0,9990
$y = 2E+06x - 136\ 776$	0,9973
$y = 2E+06x - 16\ 987$	0,9999
$y = 2E+06x + 2\ 2807$	0,9997
$y = 2E+06x + 6\ 974,4$	0,9997
$y = 2E+06x - 19\ 516$	0,9999

Para que o modelo linear fosse adequado aos valores experimentais obtidos para o maltitol, todos os valores de r^2 teriam de ser superiores 0,98; o que se veio a comprovar pelos valores registados na tabela 12.

Das oito curvas de calibração determinadas para o maltitol, selecionou-se uma delas (representada graficamente na figura 13), para ser avaliada pelo teste de RIKILT. Todos os dados obtidos pelo teste foram registados na tabela 13.

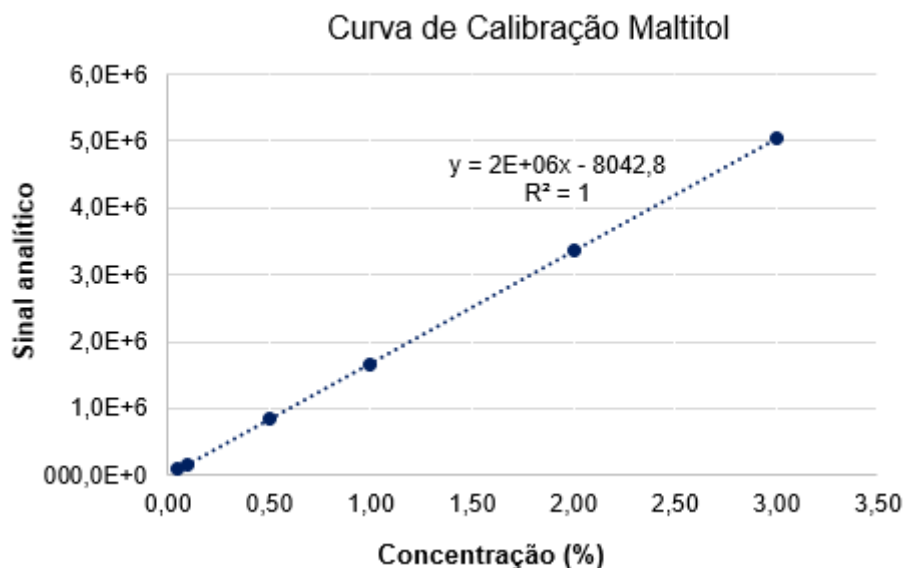


Figura 13: Representação gráfica de uma curva de calibração obtida para o maltitol.

Tabela 13 – Avaliação da linearidade da reta de calibração do maltitol através do teste de RIKILT

X_i	Y_i	$\frac{Y_i}{X_i}$	$\frac{\frac{Y_i}{X_i}}{m\left(\frac{Y_i}{X_i}\right)} \times 100\%$
0,0500	87 996,20	1 759 853,606	105,12
0,1000	151 626,80	1 516 207,352	90,57
0,5000	832 012,30	1 663 958,042	99,40
1,0000	1 670 994,90	1 670 928,063	99,81
2,0001	3 354 591,30	1 677 228,561	100,19
3,0001	5 040 791,00	1 680 196,459	100,37

Tal como para o xilitol e o sorbitol, também para o maltitol se confirmou que todos os pontos da reta de calibração se encontravam no intervalo entre 90 e 110%, aceite pelo teste de RIKILT, pelo que se concluiu que o método também é linear para este analito.

7.3. GAMA DE TRABALHO

A escolha da gama de trabalho é muito importante para que o analista possa saber qual o intervalo de concentrações em que o analito pode ser determinado e quantificado de forma precisa e exata.

A gama analítica pode ser avaliada segundo o teste de homogeneidade de variâncias que consiste na análise de dez réplicas independentes das áreas de pico obtidas para o primeiro e o último padrão, com o objetivo de verificar se existe diferença significativa entre as variâncias, nos limites da gama de trabalho (tabelas 14 a 16). Esta averiguação passa pela comparação entre o valor teste de F (TV) e o valor crítico de F, segundo a distribuição de *Snedecor / Fisher*.

É de salientar que a gama analítica foi avaliada para cada um dos três polióis de forma individual.

- Xilitol

Tabela 14 – Avaliação da gama de trabalho segundo o teste de homogeneidade de variâncias, para o xilitol

Réplicas	padrão 1 (0,05%)	padrão 6 (3,00%)
Y1	856 736,3	4 313 833,0
Y2	894 900,6	4 333 470,0
Y3	868 499,4	4 328 292,5
Y4	876 951,6	4 326 344,5
Y5	857 217,2	4 304 976,0
Y6	875 907,8	4 322 657,0
Y7	872 888,1	4 295 894,0
Y8	877 292,3	4 312 247,0
Y9	876 520,9	4 299 272,0
Y10	867 157,6	4 298 725,5
Valor teste de F (TV)	1,521	
Valor crítico F	3,179	

Através da comparação entre o valor teste de F (TV) e o valor crítico de F apresentados na tabela 14, verifica-se que o primeiro é inferior ao segundo, o que significa que não existe diferença estatisticamente significativa entre as variâncias e, portanto, há homogeneidade de variâncias, pelo que a gama de trabalho está bem ajustada para o xilitol.

- Sorbitol

Tabela 15 – Avaliação da gama de trabalho segundo o teste de homogeneidade de variâncias, para o sorbitol

Réplicas	padrão 1 (0,05%)	padrão 6 (3,00%)
Y1	308 950,4	5 210 527,5
Y2	336 313,9	5 253 655,5

Réplicas	padrão 1 (0,05%)	padrão 6 (3,00%)
Y3	301 210,8	5 219 497,5
Y4	334 841,9	5 207 928,0
Y5	351 769,9	5 165 863,5
Y6	320 994,5	5 189 223,5
Y7	354 789,4	5 150 168,0
Y8	363 897,4	5 165 025,0
Y9	351 769,9	5 214 302,5
Y10	347 491,1	5 198 703,5
Valor teste de F (TV)	2,188	
Valor crítico F	3,179	

No caso do sorbitol o valor teste de F (TV) obtido foi de 2,188 que é inferior ao valor crítico F (3,179), pelo que se pode concluir que também para o sorbitol, a gama de trabalho está bem ajustada, uma vez que existe homogeneidade de variâncias.

- Maltitol

Tabela 16 – Avaliação da gama de trabalho segundo o teste de homogeneidade de variâncias, para o maltitol

Réplicas	padrão 1 (0,05%)	padrão 6 (3,00%)
Y1	84 693,5	5 298 963,0
Y2	104 380,7	5 272 035,0
Y3	87 077,3	5 342 147,5
Y4	78 095,0	5 304 611,0
Y5	90 470,5	5 299 404,5
Y6	87 676,2	5 289 331,5
Y7	87 996,2	5 301 400,5
Y8	87 078,7	5 305 036,5
Y9	137 654,1	5 267 417,5
Y10	104 280,0	5 333 864,0
Valor teste de F (TV)	1,864	
Valor crítico F	3,179	

Como o valor teste de F (TV) obtido para o maltitol foi de 1,864, que é inferior ao valor crítico calculado pela distribuição de Fisher ao nível de confiança de 95%, pode-se dizer que as diferenças de variância não são significativas e que a gama de trabalho está bem ajustada para a quantificação de maltitol.

7.4. SENSIBILIDADE

A sensibilidade do método pode ser calculada através da relação que existe entre o sinal analítico e a concentração de analito, pelo que depende das condições instrumentais. Se o aparelho de medição estiver bem calibrado e se todas as condições para a análise estiverem asseguradas, é possível verificar se o método é sensível a pequenas variações de concentração na amostra. Uma vez que já se confirmou que as curvas de calibração dos polióis analisados seguiam um modelo linear, a sensibilidade do método pode ser verificada com base nos declives das retas.

Para determinar a sensibilidade do método foi traçada uma curva de calibração média, com base em todas as curvas obtidas ao longo do tempo de estágio. Na tabela 17 apresentam-se os valores de sensibilidade (declive das retas) do método, bem como os desvios-padrão associados aos valores de sensibilidade. O desvio-padrão (s) foi obtido através da equação 27, onde o erro padrão do declive foi obtido pela opção presente no Excel “Análise de Dados: Regressão” para um intervalo de confiança de 95%.

$$s = \text{erro padrão} \times \sqrt{N} \quad (27)$$

A $\sqrt{N}$ representa a raiz quadrada do conjunto de dados necessários para a construção da reta, ou seja, $N=6$.

Tabela 17 – Sensibilidade e desvio-padrão associado, obtidos para os polióis em estudo

	Sensibilidade ± desvio-padrão
Xilitol	822 455 ± 42 921,81
Sorbitol	2 000 000 ± 62 220,85
Maltitol	2 000 000 ± 26 703,48

Tanto para o sorbitol como para o maltitol, os declives das retas obtidos são semelhantes. No caso do xilitol, o declive obtido é inferior. Por este motivo, concluiu-se que o método é mais sensível para o sorbitol e maltitol do que para o xilitol.

O maltitol é o que apresenta um desvio padrão mais baixo, o que pode estar relacionado com o facto de ser o que apresenta uma melhor separação cromatográfica, dado que tem maior afinidade com a fase estacionária.

7.5. DESVIO-PADRÃO DO MÉTODO

Para o cálculo do desvio padrão do método (S_m), é necessário conhecer o desvio padrão residual ($S_{y/x}$), que foi obtido através da opção do Excel “Análise de Dados: Regressão”.

Os valores de S_m e de DP % estão apresentados na tabela 18, para cada um dos polióis.

Tabela 18 – Apresentação dos valores de desvio-padrão obtidos para cada poliol

	$S_{y/x}$	S_m	DP %
Xilitol	24 780,92	0,012	1,65
Sorbitol	35 923,23	0,018	2,39
Maltitol	15 417,26	0,008	1,03

Com base na análise da tabela 18, é possível verificar que o desvio padrão do método é baixo e que o desvio padrão relativo é inferior a 10%, por este motivo, o método foi bem executado para cada poliol.

7.6. LIMITES ANALÍTICOS

O limite de detecção corresponde à concentração mínima de analito que é detetada, não sendo necessariamente possível de quantificar, já o limite de quantificação corresponde à concentração mínima em que é possível quantificar o analito com confiança.

É de referir que de acordo com o procedimento interno da empresa, quando se efetuam validações de métodos, apenas é do seu interesse validar o limite de quantificação (LQ), não sendo relevante validar o limite de detecção (LD). Ainda assim, ambos foram calculados com base nas equações 12 e 13. Os limites obtidos encontram-se registados na tabela 19.

Tabela 19 – Valores obtidos para os limites de quantificação e de detecção

	LQ (%)	LD (%)
Xilitol	0,124	0,041
Sorbitol	0,180	0,059
Maltitol	0,077	0,025

Tendo em conta os resultados obtidos, para definir um LQ para o método, teria de se chegar a um consenso entre os LQ's obtidos para cada poliol.

Dada a definição de limite de quantificação, o valor estabelecido para o LQ seria de 0,180%; uma vez que se o xilitol e o maltitol conseguem ser quantificados com confiança a uma concentração de 0,124% e 0,77%, respetivamente, também o seriam em níveis de concentração mais elevados. Já o sorbitol não consegue ser quantificado com confiança em concentrações abaixo de 0,180%.

No entanto, os valores obtidos são apenas teóricos, pelo que o LQ a validar será considerado como o padrão de menor concentração (padrão 1) estabelecido internamente, ou seja, 0,05%; que é também o valor pedido pelos clientes da SGS. Este valor será validado em termos de precisão (através do parâmetro repetibilidade) e exatidão, nos pontos 7.7.1. e 7.8., respetivamente.

7.7. PRECISÃO

A avaliação da precisão do método foi realizada segundo os parâmetros de repetibilidade e precisão intermédia.

7.7.1. REPETIBILIDADE

A determinação da repetibilidade de um método intralaboratorial efetua-se numa série de medições (≥ 10) sobre um mesmo padrão ou amostra. Este procedimento poderá ser repetido em inúmeros padrões com diferentes níveis de concentração, sendo satisfatória apenas a determinação da repetibilidade nos extremos da gama de trabalho, pois são os padrões que mais facilmente sofrem desvios. O método considera-se preciso em termos de repetibilidade, se o coeficiente de variação (CV_r) for inferior a 10%. Nas tabelas 20 a 22 apresentam-se os resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade de cada poliol.

- Xilitol

Tabela 20 – Avaliação da repetibilidade para o xilitol: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CV_r) e limite de repetibilidade (Δr)

Y - padrão 1	Y - padrão 6
856 736,3	4 313 833,0
864 900,6	4 333 470,0
868 499,4	4 328 292,5
876 951,6	4 326 344,5
857 217,2	4 304 976,0
875 907,8	4 322 657,0
872 888,1	4 295 894,0
877 292,3	4 312 247,0
876 520,9	4 299 272,0

	Y - padrão 1	Y - padrão 6
	867 157,6	4 298 725,5
Média	870 693,8	4 313 040,0
Desvio-padrão	7 479,40	12 928,39
CVr (%)	0,86	0,30
Δr	23 926,23	41 57,29

Mediante a análise dos resultados da tabela 20, o método apresenta boa repetibilidade para a análise de xilitol, uma vez que o CVr é bastante inferior ao limite estipulado (10%). Quanto menor for o CVr, melhor é a repetibilidade.

- Sorbitol

Tabela 21 – Avaliação da repetibilidade para o sorbitol: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CVr) e limite de repetibilidade (Δr)

	Y - padrão 1	Y - padrão 6
	308 950,4	5 210 527,5
	336 313,9	5 283 655,5
	301 210,8	5 269 497,5
	334 841,9	5 207 928,0
	308 697,9	5 165 863,5
	320 994,5	5 189 223,5
	354 789,4	5 150 168,0
	298 114,6	5 165 025,0
	351 769,9	5 214 302,5
	347 491,1	5 141 703,5
Média	327 918,2	5 198 575,8
Desvio-padrão	20 360,60	45 378,78
CVr (%)	6,21	0,87
Δr	65 132,55	145 64,51

Pela análise dos coeficientes de variação pode-se considerar o método validado em termos de repetibilidade para o sorbitol, dado que os valores determinados são inferiores a 10%. Comparando os resultados obtidos para o xilitol e o sorbitol, conclui-se que o método se adequa melhor à determinação de xilitol, dado que os coeficientes registados para este poliol foram inferiores.

- Maltitol

Tabela 22 – Avaliação da repetibilidade para o maltitol: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CVr) e limite de repetibilidade (Δr)

	Y - padrão 1	Y - padrão 6
	84 693,5	5 298 963,0
	104 380,7	5 272 035,0
	87 077,3	5 342 147,5
	78 095,0	5 304 611,0
	90 470,5	5 299 404,5
	87 676,2	5 289 331,5
	87 996,2	5 301 400,5
	87 078,7	5 305 036,5
	137 654,1	5 337 091,3
	104 280,0	5 333 864,0
Média	87 836,2	5 303 005,8
Desvio-padrão	16 230,15	21 309,99
CVr (%)	18,48	0,40
Δr	51 919,47	68 169,60

No caso do maltitol, registou-se um CVr acima de 10% para o padrão 1, que pode estar associado a erros que possam ter ocorrido durante a preparação deste padrão, dada a concentração de analito ser muito baixa. Como para o padrão 2 o coeficiente de variação não ultrapassou o limite, considerou-se o método validado em termos de repetibilidade para o maltitol.

Em todos os casos se verificou que o padrão 1 apresentou um CVr superior ao do padrão 6, o que pode estar relacionado com a pequena quantidade de analito presente no padrão 1 (padrão de menor concentração), bem como um maior número de erros aleatórios associados ao seu processo de medição.

Analisando todos os resultados obtidos para cada poliol, concluiu-se que o método estava validado ao nível do LQ em termos de repetibilidade (precisão).

Uma vez validada a repetibilidade do método, procedeu-se à análise deste parâmetro na amostra escolhida para o estudo. Neste caso, em vez de se considerarem 10 réplicas do sinal analítico, foram consideradas 10 réplicas da concentração de cada analito (tabela 23).

- Amostra

É de notar que apesar da amostra conter xilitol, sorbitol e maltitol, no caso dos dois primeiros, os valores obtidos são inferiores ao LQ, pelo que não é possível quantificá-los com confiança. Por este motivo, na tabela 23, tanto para o xilitol como para o sorbitol assume-se uma concentração nula, ou seja, que a amostra só contém maltitol.

Tabela 23 – Avaliação da repetibilidade na amostra: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CVr) e limite de repetibilidade (Δr)

	Xilitol (g/100g)	Sorbitol (g/100g)	Maltitol (g/100g)
	0,000	0,000	17,070
	0,000	0,000	17,116
	0,000	0,000	16,476
	0,000	0,000	18,713
	0,000	0,000	19,059
	0,000	0,000	20,354
	0,000	0,000	17,867
	0,000	0,000	18,426
	0,000	0,000	19,132
	0,000	0,000	17,058
Média	-	-	18,1
Desvio-padrão	-	-	1,16
CVr (%)	-	-	6,37
Δr	-	-	3,70

Pela análise do coeficiente de variação, assume-se que o método está validado em termos de determinação da repetibilidade na amostra, dado o coeficiente de variação obtido para o maltitol ser inferior a 10%.

7.7.2. PRECISÃO INTERMÉDIA

A precisão também pode ser avaliada com recurso ao parâmetro da precisão intermédia. A precisão intermédia foi analisada pela dispersão dos resultados obtidos entre 5 réplicas de cada padrão (menor e maior concentração) preparadas em 3 dias diferentes. O mesmo procedimento foi adotado para a amostra. O objetivo foi avaliar qual a influência do fator dia nos resultados alcançados. O método considera-se preciso em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação (CPI) for inferior a 5,0%

Nas tabelas seguintes encontram-se os valores obtidos para a análise da precisão intermédia de cada poliol.

- Xilitol

Tabela 24 – Resultados obtidos na análise da precisão para quantificação de xilitol

Dia	Sinal analítico obtido nas réplicas do padrão 1					média	Desvio-padrão	CPI (%)
1	140606,3	142543,7	141310,1	142273,8	144481,1	141 642,6	1 432,23	1,01
2	180599,8	160560,8	167 701,8	164150,8	168426,3	165 926,3	6 827,55	4,11
3	111268,8	104513,0	103831,4	98674,3	99593,7	103 397,4	4 470,73	4,32
Dia	Sinal analítico obtido nas réplicas do padrão 6					média	Desvio-padrão	CPI (%)
1	4696532,0	4666667,5	4719108,5	4650635,5	4718862,5	4 684 749,0	27 502,67	0,59
2	490 479,5	4775221,5	4833206,5	4676551,5	4760787,0	4 786 352,5	52 221,45	1,09
3	4916835,0	4925151,0	4794959,0	4973281,5	4931349,0	4 921 983,0	59 322,07	1,21

Mediante a análise dos resultados da tabela 24, o método apresenta boa precisão intermédia para a análise de xilitol, uma vez que os CPI's resultantes são todos inferiores a 5%, comprovando assim o objetivo, ou seja, que o fator dia não tem influência na avaliação da precisão.

- Sorbitol

Tabela 25 – Resultados obtidos na análise da precisão para quantificação de sorbitol

Dia	Sinal analítico obtido nas réplicas do padrão 1					média	Desvio-padrão	CPI (%)
1	58895,1	58973,1	55070,7	5 934,3	58755,2	588 30,2	1 483,57	2,52
2	123571,8	120688,4	119330,8	127145,8	131238,3	126 960,8	4 428,74	3,49
3	53853,3	49087,5	47920,4	50386,85	47948,45	49 976,5	2 169,34	4,34
Dia	Sinal analítico obtido nas réplicas do padrão 6					média	Desvio-padrão	CPI
1	5215114,0	5396000,0	5358128,5	5326040,5	5304123,5	5 315 082,0	21 644,59	0,41
2	5308104,5	5395367,0	5253420,0	5453300,0	5361583,5	5 353 346,0	55 609,49	1,04
3	5733200,0	5692371,0	5415868,0	5554113,5	5672454,3	5 632 454,3	109856,44	1,95

Os baixos valores de coeficiente de variação (<5%) obtidos neste estudo, confirmam a precisão do método analítico para a quantificação de sorbitol por HPLC, e comprovam que o fator dia não tem influência na quantificação do mesmo.

- Maltitol

Tabela 26 – Resultados obtidos na análise da precisão para quantificação de maltitol

Dia	Sinal analítico obtido nas réplicas do padrão 1					média	Desvio-padrão	CPi (%)
1	92192,6	93823,0	94116,4	93529,6	93117,8	93 309,6	719,95	0,77
2	104626,2	112697,9	101515,9	106570,3	113502,8	107 489,6	4 750,71	4,42
3	95625,6	89895,3	91420,7	88909,2	91653,5	91 398,6	2 298,38	2,51
Dia	Sinal analítico obtido nas réplicas do padrão 6					média	Desvio-padrão	CPi (%)
1	5492803,5	5412350,5	5489647,5	5496180,5	5370983,0	5 489 647,5	51 321,03	0,93
2	5414745,0	5534981,5	5491065,5	5474866,4	5492927,5	5 491 065,5	38 941,90	0,71
3	5518652,5	5521408,5	5512015,0	5569485,5	5539030,5	5 521 408,5	20 708,72	0,38

Todos os coeficientes obtidos para ambos os padrões são inferiores ao limite máximo estabelecido para que um método possa ser considerado preciso. Por este motivo, comprovou-se a precisão do mesmo para a quantificação de maltitol. Conclui-se ainda que, mais uma vez, o fator dia não tem impacto na avaliação da precisão.

Uma vez testada a precisão intermédia do método para a quantificação dos polióis em dois níveis de concentração (padrão 1 e padrão 6), repetiu-se o procedimento para a amostra. Dado que na análise do parâmetro da repetibilidade se constatou que a amostra não continha xilitol nem sorbitol, a avaliação da precisão intermédia foi apenas realizada para o maltitol (tabela 27).

- Amostra

Tabela 27 – Resultados obtidos na análise da precisão para quantificação de maltitol na amostra em estudo

Dia	Concentração (g/100g) obtida nas réplicas da amostra					média	Desvio-padrão	CPi (%)
1	18,125	18,087	18,257	18,206	18,196	18,20	0,06	0,33
2	17,521	17,528	17,205	17,314	17,286	17,29	0,11	0,63
3	17,528	18,160	17,794	17,387	17,519	17,53	0,27	1,57

Tendo em conta os resultados obtidos, pode concluir-se que a precisão intermédia avaliada na amostra é satisfatória, uma vez que todos os coeficientes de variação obtidos são inferiores ao valor estabelecido como limite (5%).

7.8. EXATIDÃO

A exatidão trata-se de um parâmetro que mede a proximidade entre um valor obtido ou a média dos valores obtidos com o valor verdadeiro (de referência). A avaliação da exatidão foi feita através de ensaios de recuperação, em que a amostra foi fortificada com três níveis de concentração distintos: nível baixo ou nível do LQ (0,05%), nível médio (1,00%) e nível alto (3,00%). Se a taxa de recuperação estiver compreendida num intervalo entre 80% e 120%, o método é considerado exato. No ANEXO 7, encontra-se um exemplo de um cromatograma obtido na análise da exatidão, que compara os picos obtidos na amostra sem fortificação e na amostra com fortificação.

Para o cálculo das taxas de recuperação, foi necessário saber qual a concentração inicial da amostra antes da fortificação e qual o volume de solução stock a adicionar à amostra consoante o nível de fortificação (equação 25) para um volume final de 50 mL.

Nas próximas tabelas serão apresentados os valores referentes às taxas de recuperação obtidos em triplicado para cada nível de fortificação da amostra.

- Xilitol

Tabela 28 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o xilitol ao nível do LQ (0,05%)

Concentração de fortificação	Ci (g/100g)	V de padrão adicionado (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R %	$\bar{R}$ %
0,05%	0,00	0,5	1	0,408	81,56	84,18
			2	0,434	86,80	
			3	0,394	78,89	
			4	0,458	91,63	

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que à exceção do ensaio 3, todos os outros apresentaram taxas de recuperação dentro do intervalo de aceitação (80% a 120%).

O facto da taxa de recuperação obtida no ensaio 3 estar abaixo do limite, pode estar relacionada com erros de medição ocorridos durante a fortificação da amostra, uma vez que o volume a adicionar é relativamente baixo.

No entanto, tendo em conta que a média das taxas de recuperação está dentro dos limites, considerou-se que o método analítico apresenta boa exatidão para a determinação de xilitol ao nível do LQ.

Tabela 29 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o xilitol no nível médio de fortificação (1,00%)

Concentração de fortificação	Ci (g/100g)	V de padrão adicionado (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R %	$\bar{R}$ %
1,00%	0,00	10,0	1	8,074	80,74	81,04
			2	8,016	80,19	
			3	8,232	82,32	
			4	8,131	81,34	

Com base nas taxas de recuperação obtidas e na média das mesmas, pode-se concluir que no nível médio de fortificação, o método possui uma taxa de recuperação para o xilitol, dentro do intervalo considerado aceitável, logo apresenta boa exatidão para a quantificação do analito a este nível.

Tabela 30 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o xilitol no nível alto de fortificação (3,00%)

Concentração de fortificação	Ci (g/100g)	V de padrão adicionado (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R %	$\bar{R}$ %
3,00%	0,00	30,0	1	31,207	104,05	105,51
			2	32,542	108,51	
			3	30,231	100,78	
			4	32,085	106,98	

A média das taxas de recuperação obtidas para o xilitol no nível de fortificação mais elevado foi de 105,51%. Sendo que este valor está dentro do intervalo de aceitação estipulado, conclui-se que o método apresenta uma exatidão satisfatória para o analito, neste nível de concentração.

- Sorbitol

Tabela 31 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o sorbitol ao nível do LQ (0,05%)

Concentração de fortificação	Ci (g/100g)	V de padrão adicionado (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R %	$\bar{R}$ %
0,05%	0,000	0,5	1	0,411	82,15	84,75
			2	0,401	80,20	
			3	0,466	93,18	
			4	0,437	87,35	

Pela observação dos resultados obtidos para a exatidão do sorbitol ao nível do LQ, pode-se constatar que a percentagem de recuperação se encontra dentro dos limites estipulados, de acordo com o critério de aceitação. Deste modo, conclui-se que o método é exato.

Tabela 32 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o sorbitol no nível médio de fortificação (1,00%)

Concentração de fortificação	Ci (g/100g)	V de padrão adicionado (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R %	$\bar{R}$ %
1,00%	0,000	10,0	1	8,518	85,18	83,89
			2	8,076	80,80	
			3	8,258	82,60	
			4	8,568	85,71	

Como pode ser observado na tabela 32, todos os valores individuais de recuperação estão entre 80% e 120%, comprovando assim que o método é exato na quantificação de sorbitol ao nível médio de fortificação.

Tabela 33 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o sorbitol no nível alto de fortificação (3,00%)

Concentração de fortificação	Ci (g/100g)	V de padrão adicionado (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R %	$\bar{R}$ %
3,00%	0,000	30,0	1	27,598	92,01	100,76
			2	30,156	101,75	
			3	30,090	100,32	
			4	30,351	101,20	

Para os 4 ensaios de recuperação de sorbitol realizados no nível de fortificação de 3,00%, registaram-se valores de taxas de recuperação dentro do intervalo de aceitação, concluindo-se assim que a exatidão obtida foi satisfatória para o objetivo pretendido.

- Maltitol

Tabela 34 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o maltitol ao nível do LQ (0,05%)

Concentração de fortificação	Ci (g/100g)	V de padrão adicionado (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R %	$\bar{R}$ %
0,05%	18,110	0,5	1	18,532	85,41	97,86
			2	18,590	96,43	
			3	18,604	99,29	
			4	18,608	99,79	

Analisando os resultados obtidos, todos os ensaios apresentaram taxas de recuperação dentro do intervalo de aceitação. Por este motivo considerou-se que o método analítico apresenta uma exatidão satisfatória para a determinação de maltitol ao nível do LQ.

Tabela 35 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o maltitol no nível médio de fortificação (1,00%)

Concentração de fortificação	Ci (g/100g)	V de padrão adicionado (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R %	$\bar{R}$ %
1,00%	18,152	10,0	1	26,903	87,47	84,88
			2	26,597	84,51	
			3	26,543	83,92	
			4	26,673	85,25	

Consoante as taxas de recuperação obtidas e a média das mesmas, pode-se concluir que no nível médio de fortificação, o método apresentou taxas de recuperação de maltitol dentro do intervalo considerado aceitável, ou seja, apresenta uma boa exatidão para a quantificação do analito a este nível.

Tabela 36 – Cálculo das taxas de recuperação obtidas para o maltitol no nível alto de fortificação (3,00%)

Concentração de fortificação	Ci (g/100g)	V de padrão adicionado (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R %	$\bar{R}$ %
3,00%	17,360	30,0	1	47,623	100,90	105,62
			2	49,335	106,63	
			3	49,280	106,42	
			4	48,795	104,82	

A média das taxas de recuperação obtidas para o maltitol no nível de fortificação de 3,00% foi de 105,62%. Sendo que este valor está dentro dos limites determinados, concluiu-se que a exatidão obtida foi satisfatória para a determinação de maltitol no nível mais alto de fortificação.

8. CONCLUSÃO

Os polióis são carboidratos que têm vindo a ser cada vez mais procurados em consequência do aumento da procura por um estilo de vida mais saudável, ou pelo aparecimento de doenças como a obesidade e a diabetes. Na indústria alimentar, os polióis são usados como substitutos da sacarose, uma vez que apesar de também conterem um elevado poder adoçante, são mais baixos em calorias.

O presente trabalho tinha como objetivo a validação de um método que permitisse à empresa realizar análises a produtos alimentares que contivessem ou não polióis nas suas formulações, com um grau de confiança adequado. Esse objetivo foi alcançado, uma vez que todos os requisitos necessários para a validação de um método analítico foram alcançados.

Os primeiros parâmetros avaliados foram a seletividade e especificidade. Para analisar a especificidade foram injetadas amostras individuais de xilitol, sorbitol e maltitol, com diferentes níveis de concentração (0,05%; 0,50% e 3,00%). Dado que para cada analito o tempo de retenção manteve-se constante independentemente das concentrações analisadas, aumentando apenas a intensidade do pico, o método mostrou ser específico para cada analito. Já a seletividade foi avaliada através da injeção de uma solução que continha todos os polióis em simultâneo. O método mostrou ser seletivo, uma vez que conseguiu identificar, separar e quantificar todos os analitos, sem interferência no seu tempo de retenção.

A linearidade foi outro parâmetro avaliado. Neste caso foram analisados os coeficientes de determinação de cada reta traçada ao longo dos vários dias, que tinham de ser superiores a 0,98; tal como se veio a comprovar. Como o coeficiente de determinação não é por si só um requisito da linearidade, submeteu-se uma das várias curvas obtidas para cada poliol ao teste de RIKILT. Como os resultados obtidos para este teste estavam dentro dos limites do mesmo, ou seja, entre os 90% e 110%, concluiu-se que o método era linear. Após comprovar a linearidade, pode-se estudar a sensibilidade, que corresponde aos declives das retas obtidas. Em termos de sensibilidade, o método mostrou-se mais sensível para a quantificação de sorbitol e de maltitol, do que para a quantificação de xilitol.

A gama de trabalho escolhida (0,05% a 3,00%) também revelou ser adequada, uma vez que quando submetida ao teste de homogeneidade de variâncias para o primeiro e último padrão, se conclui que as diferenças de variâncias obtidas não eram significativas.

Quanto ao limite de quantificação, foi estabelecido como sendo o padrão de menor concentração, ou seja, 0,05%; que foi validado em termos de repetibilidade e exatidão, apresentando resultados satisfatórios. O limite de deteção não foi validado, uma vez que para a empresa apenas era relevante validar o LQ.

Para a repetibilidade, os valores de CVr obtidos foram inferiores a 10% para os três polióis analisados, sendo assim, a repetibilidade foi considerada satisfatória.

Também para o estudo da precisão intermédia, os valores de CPi foram inferiores a 5%, pelo que também este parâmetro foi considerado satisfatório, e consequentemente validado

No estudo da exatidão, foi possível comprovar que todas as taxas de recuperação obtidas para os três polióis, nos três níveis de concentração (0,05%; 1,00% e 3,00%), se encontravam no intervalo de aceitação de 80% a 120%, comprovando assim a exatidão do método.

Uma vez que todos os parâmetros foram cumpridos, o método foi bem validado.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] <https://www.sgs.pt/pt-pt/our-company/about-sgs/sgs-in-brief> (consultado a 07/04/2022).
- [2] Peri, C.; The universe of food quality. In *Food Quality and Preference*, 3-8; 2006.
- [3] Neves, A.; Santos, B.; *Projeto Biotecnológico sobre a Produção de Leite Sem Lactose*, Instituto Politécnico de Setúbal, 2022.
- [4] Duarte, A.; *Validação de um método analítico para a determinação de polióis por cromatografia líquida de alta eficiência*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2021.
- [5] Martins, F.; Pinho, O.; Ferreira, I.; *Alimentos Funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação*. 2004:
<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/52634/2/47158.pdf> - (consultado a 12/04/2022).
- [6] Silva, P.; *Determinação de compostos fenólicos por HPLC*; Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior - Ciências; 2012.
- [7] Figueiredo, T.; *Validação de Métodos Analíticos – Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar*; Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; 2012.
- [8] Ferreira, A.; *Validação da Determinação de Teobromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*; Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2013.
- [9] Martins, A.; *Implementação e Validação de Métodos Analíticos*; Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; 2016.
- [10] Henriques, C.; *Implementação e Validação de Metodologias Analíticas*; Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2020.
- [11] Harris, D.; *Chemical Analysis 7th ed*; W. H. Freeman and Company; New York; 2007.
- [12] Sousa, D.; *Validação de Método Analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de um Medicamento de associação dupla (20mg + 40mg)*; Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2018.
- [13] <http://www.farmacognosiaws.no.comunidades.net/cromatografia-normal-e-reversa> (consultado a 21/05/2022).
- [14] https://www.waters.com/waters/pt_PT/How-Does-High-Performance-Liquid-ChromatographyWork%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt_PT (consultado a 27/05/2022).

[15] Salatino, M.; Técnicas básicas de Cromatografia. 2016:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1842690/mod_resource/content/1/Aula%202%20-%20T%C3%A9cnicas%20de%20cromatografia.pdf - (consultado a 27/05/2022).

[16] Skoog, D.; West, D.; Holler, F.; Crouch, S.; *Fundamentals of Analytical Chemistry* 8th ed; Belmont, Calif.: Brooks/Cole; USA, 2004.

[17] Moraes, J.; *Desenvolvimento de produtos de doçaria tradicional dirigidos ao consumo por diabéticos*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2016.

[18] Rocha, D.; Ferreira, V.; Silva, F.; *Potencialidades e Oportunidades na Química da Sacarose e outros Açúcares*. 2009:

<https://www.scielo.br/j/qn/a/hH8YSXNnbfdZbsPX7DqmJFx/?format=pdf&lang=pt> - (consultado a 02/04/2009).

[19] Pennington, N.; Baker, C.; *Sugar: A User's Guide to Sucrose*. Springer Science & Business Media, New York, 1990.

[20]-<http://www.fpcardiologia.pt/saude-do-coracao/factores-de-risco/obesidade/> (consultado a 12/04/2022).

[21] Pimentel, T.; *Suco clarificado de maçã com Lactobacillus paracasei ssp. paracasei e oligofrutose ou sucralose: aspectos sensoriais e estabilidade físico-química, pre e probiótica em armazenamento refrigerado*. Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de Londrina, 2014.

[22] World Health Organization. *Codex Alimentarius Commission*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, 2016.].

[23] Pereira, J.; Formigoni, M.; Viell, F.; Pante, G.; Bona, E.; Vieira, A.; Aditivos Alimentares Naturais Emergentes: Uma revisão. In *Realidades e Perspetivas em Ciência dos Alimentos*, 46, Pantanal Editora, Mato Grosso – Brasil, 2020.].

[24] Porto, A.; *Contributo para a estimativa da prevalência da ingestão de edulcorantes intensos num grupo de jovens estudantes em Portugal continental*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2010.

[25] Martins, F.; Sentanin, M.; Douza, D.; *Food Chemistry*. 30/01/2019, 732-750, Elsevier.

[26] Shankar, P.; Ahuja, S.; Sriram, K.; Non-nutritive sweeteners: Review and update. In *Nutrition*, 1293-1299, 2013.

[27] <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIR.0b013e31825c42ee> (consultado a 14/04/2022).

[28] Fitch, C.; Keim, K.; Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. In *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 739-758, 2012.

[29] Grembecka, M.; *Sugar alcohols – their role in the modern world of sweeteners: a review*. Springer Link, 28/02/2015, Gdansk.

[30] Grabitske, H.; Slavin, J.; *Low-Digestible Carbohydrates in Practice*. In *Journal of the American Dietetic Association*, 1677-1681, 2008.

- [31] Saraiva, A.; Carrascosa, C.; Raheem, D.; Ramos, F.; Raposo, A.; *Maltitol: Analytical Determination Methods, Applications in The Food Industry, Metabolism and Health Impacts*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 20/07/2020, MDPI, Suíça.
- [32] Ho, L. H.; Pulsawat, M. M.; *Effects of partial sugar replacement on the physicochemical and sensory properties of low sugar cookies*. International Food Research Journal 05/05/2020, 557-567, Malásia.
- [33] Sheet, B.; Artik, N.; Ayed, M.; Abdulaziz, O.; *Some Alternative Sweeteners (Xylitol, Sorbitol, Sucralose and Stevia): Review*, 2014, 63-70, Turquia.
- [34] https://aditivosingredientes.com/upload_arquivos/201602/2016020229242001454345068.pdf (consultado a 23/04/2022).
- [35] <http://www.food-info.net/uk/e/e420.htm> (consultado a 23/04/2022).
- [36] Pedruzzi, I.; *Produção biotecnológica de sorbitol e ácido lactobiónico com separação simultânea em sistema de leito móvel simulado*. Dissertação de Doutorado. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2010.
- [37] Lugani, Y.; Oberoi, S.; Sooch, B.; *Xylitol: A Sugar Substitute for Patients of Diabetes Mellitus*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 13/03/2017, 741-749, Índia.
- [38] Xilitol - <http://www.food-info.net/uk/e/e967.htm> (consultado a 23/04/2022).
- [39] <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/20639/1/Valida%C3%A7%C3%A3o%20de%20um%20M%C3%A9todo%20Anal%C3%ADtico.pdf> (consultado a 24/04/2022).
- [40] Guia Relacre 2013:
<https://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/Guia%20RELACRE%2013.pdf>
- [41] Sampaio, C.; *Validação e Revalidação de Métodos na Análise de Açúcares e Farinhas*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2019.
- [42] Ploêncio, L.; *Desenvolvimento e Validação de Metodologia para Determinação de Sacarose em Mel por Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica Acoplada à Espectrometria de Massas*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Santa Catarina, 2016.
- [43] ISO 8466-1: 1990:
<file:///C:/Users/Utilizador/Downloads/ISO%208466-1-1990%20Water%20quality%20-%20Part%201.%20Statistical%20evaluation%20of%20the%20linear%20calibration%20function.pdf>
- [44] Brito, N.; Junior, O.; Polese, L.; Ribeiro, M.; *Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão*. 2003:
<https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/viewFile/3173/2546> (consultado a 23/04/2022).
- [45] ISO 5725:3: 1994:
<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5725:-3:ed-1:v1:en>
- [46] <http://www.est.ufmg.br/~edna/Tabela-F.pdf> (consultado a 07/05/2022).

[47] <https://www.passeidireto.com/arquivo/30658945/tabela-da-distribuicao-t-de-student>
(consultado a 08/05/2022).

10. ANEXOS

ANEXO 1 – Características das diferentes classes de aditivos alimentares [25]

Classe de Aditivos	Função	Exemplo
Adoçantes ou Edulcorantes	Intensificam os níveis de doçura e substituem o açúcar	Manitol
Reguladores de acidez	Controlam ou alteram o pH dos alimentos	Ácido acético
Anti-aglomerantes	Reduzem a tendência que as partículas isoladas dos alimentos têm para se aderirem umas às outras	Silicato de cálcio
Anti-espumas	Formam uma barreira que promove uma menor transferência de O ₂ , diminuindo a produção de espuma	Ésteres de ácidos gordos
Antioxidantes	Prolongam o prazo de conservação dos alimentos, protegendo-os da deterioração provocada pela oxidação	Ácido ascórbico (Vitamina C)
Acidificantes	Aumentam a acidez e/ou conferem um sabor acre	Ácido fumárico
Agentes de endurecimento	Tornam ou mantêm firmes ou estaladiços os tecidos dos frutos ou dos produtos hortícolas, ou atuam em conjunto com gelificantes para produzir ou reforçar um gel	Cloreto de cálcio
Agentes de revestimento	Fornecem uma aparência mais atrativa aos alimentos, por torná-los brilhantes	Cera de abelha
Agentes de transporte	Auxiliam na dispersão, dissolução e diluição de um aditivo alimentar sem modificar as suas propriedades	Sulfato de amónio
Agentes de tratamento da farinha	Melhoram a qualidade da cozedura	Hidrocloreto de L-cisteína
Agentes de volume	Contribuem para dar volume, sem contribuírem significativamente para o seu valor energético disponível	Polidextrose

Classe de Aditivos	Função	Exemplo
Amidos modificados	Substâncias obtidas através de um ou mais tratamentos químicos de amidos comestíveis, que podem ter sofrido um tratamento físico ou enzimático e podem ser fluidificadas por via ácida ou alcalina ou branqueadas	Amido oxidado
Conservantes	Prolongam o prazo de conservação dos alimentos, protegendo-os contra a deterioração provocada por microrganismos	Ácido sórbico
Corantes	Conferem ou restituem cor a um alimento	Betanina
Emulsionantes	Estimulam a estabilidade do alimento, aumentam o prazo de validade, inibem a separação de fases e controlam a viscosidade e a textura	Goma arábica
Espessantes	Aumentam a viscosidade	Sílica
Espumantes	Tornam possível a dispersão homogênea de uma fase gasosa nos géneros alimentícios líquidos ou sólidos	Metiletilcelulose
Estabilizadores	Permitem a manutenção do estado físico-químico dos alimentos	Alginatos
Gases de Embalagem	Gases, com exceção do ar, introduzidos em recipientes antes, durante ou após a colocação dos géneros alimentícios nesses recipientes	Caseinato de sódio
Gelificantes	Promovem a formação de géis, produzindo uma estrutura tridimensional, que melhora a homogeneidade dos alimentos	Pectina
Humidificantes	Impedem a secagem ou promovem a dissolução de um pó num meio aquoso	Glicerol
Intensificadores de sabor	Intensificam o sabor com vista a uma maior aceitação por parte do consumidor	Glutamato monossódico
Levedantes químicos	Substâncias que libertam gás, aumentando o volume das massas ou polmes de farinha	Carbonato de sódio

Classe de Aditivos	Função	Exemplo
Propulsores	Gases, com exceção do ar, que expellem os géneros alimentícios dos recipientes	Dióxido de carbono
Sais de fusão	Permitem uma distribuição homogénea das gorduras e outros componentes	Polifosfatos de cálcio
Sequestrantes	Formam complexos químicos com iões metálicos	EDTA

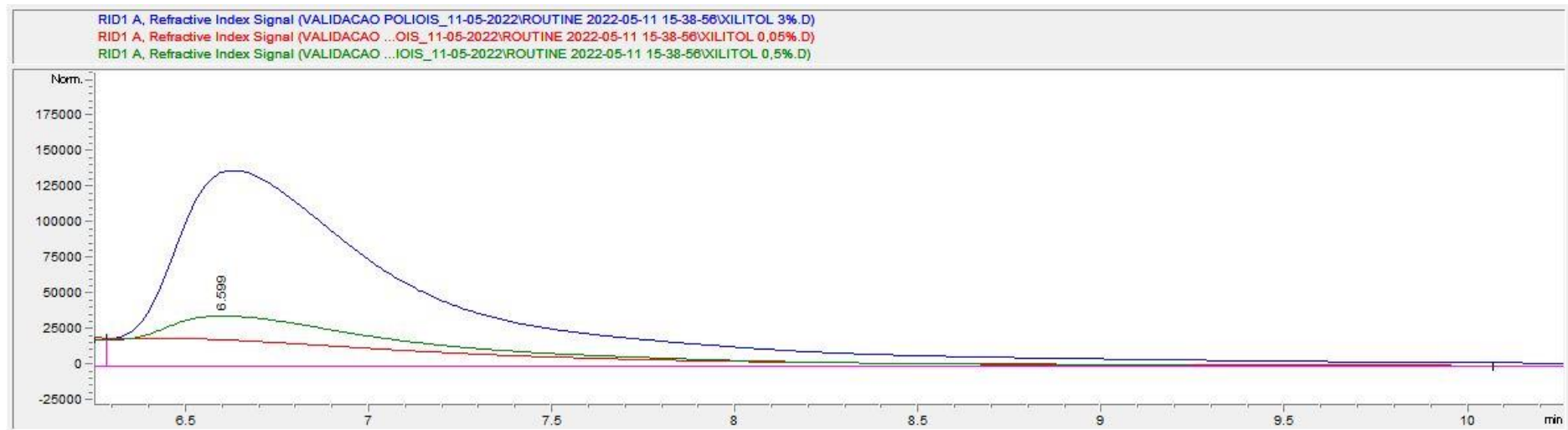
ANEXO 2 – Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade [46]

GL	V1																			
V2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	244.7	245.4	245.9	248.0	251.1	252.2	253.3	253.8
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.446	19.471	19.479	19.487	19.492
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.660	8.594	8.572	8.549	8.538
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.803	5.717	5.688	5.658	5.643
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.558	4.464	4.431	4.398	4.382
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.874	3.774	3.740	3.705	3.687
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.445	3.340	3.304	3.267	3.249
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.150	3.043	3.005	2.967	2.947
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.936	2.826	2.787	2.748	2.727
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.774	2.661	2.621	2.580	2.559
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.646	2.531	2.490	2.448	2.426
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.544	2.426	2.384	2.341	2.319
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.459	2.339	2.297	2.252	2.230
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.388	2.266	2.223	2.178	2.155
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.328	2.204	2.160	2.114	2.090
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.276	2.151	2.106	2.059	2.035
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.230	2.104	2.058	2.011	1.986
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.191	2.063	2.017	1.968	1.943
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.155	2.026	1.980	1.930	1.905
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.124	1.994	1.946	1.896	1.870
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.096	1.965	1.916	1.866	1.839
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.071	1.938	1.889	1.838	1.811
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.048	1.914	1.865	1.813	1.785
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.027	1.892	1.842	1.790	1.762
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.198	2.165	2.136	2.111	2.089	2.007	1.872	1.822	1.768	1.740
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.119	2.094	2.072	1.990	1.853	1.803	1.749	1.720
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	1.974	1.836	1.785	1.731	1.702
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	1.959	1.820	1.769	1.714	1.685
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	1.945	1.806	1.754	1.698	1.669
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.932	1.792	1.740	1.683	1.654
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	2.038	2.003	1.974	1.948	1.924	1.839	1.693	1.637	1.577	1.544
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.986	1.952	1.921	1.895	1.871	1.784	1.634	1.576	1.511	1.476
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993	1.952	1.917	1.887	1.860	1.836	1.748	1.594	1.534	1.467	1.430
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951	1.910	1.875	1.845	1.817	1.793	1.703	1.545	1.482	1.411	1.370
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.886	1.850	1.819	1.792	1.768	1.676	1.515	1.450	1.376	1.333

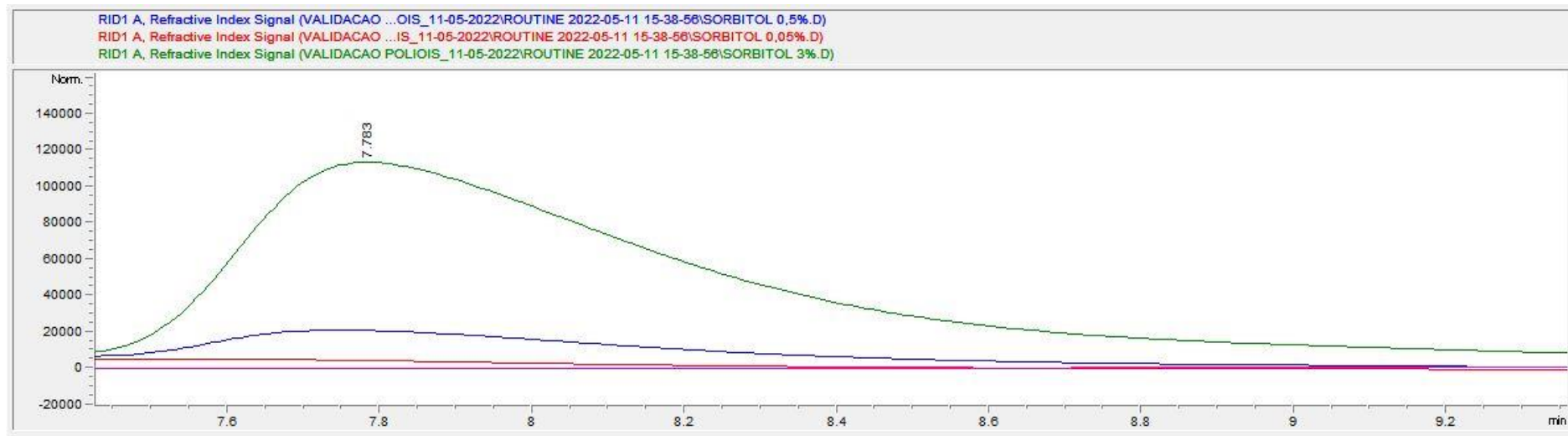
ANEXO 3 – Valores críticos da distribuição bilateral t-student [47]

Probabilidade de um t em valor absoluto superior ao tabelado											
GL	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,002	0,001
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	127,321	318,289	636,578
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	14,089	22,328	31,600
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,214	12,924
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,610
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,894	6,869
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959
7	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,029	4,785	5,408
8	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	3,833	4,501	5,041
9	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,297	4,781
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,144	4,587
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,497	4,025	4,437
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,428	3,930	4,318
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,372	3,852	4,221
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,326	3,787	4,140
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,286	3,733	4,073
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,252	3,686	4,015
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,222	3,646	3,965
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,197	3,610	3,922
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,174	3,579	3,883
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,552	3,850
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,135	3,527	3,819
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,119	3,505	3,792
23	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,104	3,485	3,768
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,091	3,467	3,745
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,078	3,450	3,725
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,067	3,435	3,707
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,057	3,421	3,689
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,047	3,408	3,674
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,038	3,396	3,660
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,385	3,646
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,307	3,551

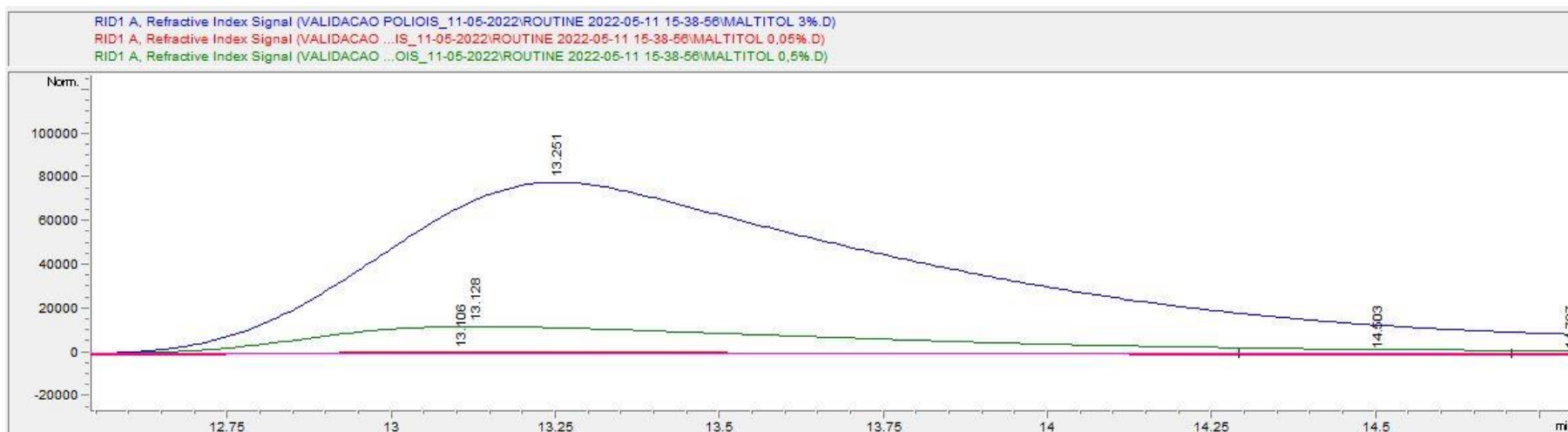
ANEXO 4 – Cromatogramas obtidos para o xilitol nas concentrações de 0,05%, 0,5% e 3%



ANEXO 5 – Cromatogramas obtidos para o sorbitol nas concentrações de 0,05%, 0,5% e 3%



ANEXO 6 – Cromatogramas obtidos para o maltitol nas concentrações de 0,05%, 0,5% e 3%



ANEXO 7 – Comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra sem fortificação e para a amostra fortificada a 1%

