



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

Perfil e Quantificação de Açúcares e Ácidos Orgânicos em Hortofrutícolas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

FAYRUZY COSTA PAIVA
(Licenciada)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Mestre Maria Manuela Lageiro
Doutora Maria Celeste Serra

Júri:

Doutora Rita Pacheco
Doutora Elsa Vasco

Janeiro 2020

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no âmbito do 2º Ciclo em Engenharia Química e Biológica – ramo de Bioprocessos do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, na Unidade de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP, sob a orientação da Mestre Maria Manuela Lageiro e da Professora Doutora Maria Celeste Serra.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por seu infinito amor, pelo dom da vida, saúde, orientação e ajuda que me foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Aos meus pais, por me ensinarem com dedicação o caminho da retidão, pelo amor incondicional e apoio prestados em todos os momentos de minha vida.

Ao meu esposo Elenilson Silva pelo amor, paciência, companheirismo e ajuda durante esse período.

Ao meu filho Pedro Daniel Silva, por cada gesto, por cada sorriso sincero, que me fazem perceber todos os dias que todo o sacrifício vale a pena.

Às minhas orientadoras Professora Doutora Maria Celeste Serra, e Mestre Maria Manuela Lageiro, excelentes exemplos de profissionalismo. Agradeço, não apenas pela orientação, mais sobretudo pela amizade e paciência; por todo o conhecimento transmitido e pelo apoio prestado ao longo deste trabalho.

Agradeço também ao Projeto *ProEnergy*, financiado pelo PDR 2020, aos institutos e empresas parceiras pela possibilidade de desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários e colegas do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), pela oportunidade única que me foi concedida de fazer parte da equipa de estagiários deste renomado Instituto.

Ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL) e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e Biológica por contribuírem positivamente para a minha formação profissional.

Ao Professor Doutor João Pereira Gomes, coordenador do Mestrado em Engenharia Química e Biológica do ISEL pelo apoio a mim prestado sempre que se fez necessário, pela oportunidade ímpar a mim concedida de fazer parte deste excelente time de alunos e de realizar esse trabalho.

Aos familiares e amigos pelo otimismo, apoio, lealdade e paciência durante os períodos de dificuldade, em especial a minha irmã Thayany Paiva, a amiga Rosária Reginaldi e os colegas André Pinto e Inês Nunes.

E a todos aqueles que contribuíram mesmo que indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Resumo

Neste trabalho, foram determinados o perfil e o teor de açúcares (sacarose, glucose, frutose e sorbitol) e ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, láctico, acético, cítrico, málico, propiónico e ascórbico) através de métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) previamente validados, em trinta hortofrutícolas não adequados ao mercado em fresco, com vista a valorizá-los como matrizes para produção de energia e/ou extração de compostos fitoquímicos.

Os açúcares foram extraídos em água, usando soluções *Carrez* para clarificação, separados por HPLC-RI numa coluna *SugarPak*, com fase móvel EDTA cálcio (0,01 mM), a fluxo 0,6 mL/min e identificados pelos tempos de retenção. Os ácidos orgânicos foram extraídos com tampão fosfato, separados e quantificados por HPLC-PDA numa coluna C18 em fase reversa, com fase móvel KH_2PO_4 (0,025 M, pH 2,4) e acetonitrilo, 99:1 (V:V), fluxo 0,8 mL/min e deteção a 254 nm (ácido ascórbico) e 210 nm (outros ácidos).

A validação mostrou bons resultados na gama de concentrações de 1,0-30 g/L e de 0,01-4,0 g/L, para açúcares e ácidos orgânicos, respetivamente; apresentando coeficientes de correlação superiores a 0,995; boa linearidade (aplicação do *teste de Mandel*); repetibilidade ($\text{CV}_r \leq 4,5\%$) e precisão intermédia ($\text{CV}_R \leq 9,3\%$). As taxas de recuperação variaram de 78% a 111% para todos os analitos. Os limites de deteção e quantificação variaram de 0,6 a 2,1 g/100g e de 1,7 a 6,4 g/100g (açúcares) e de 4,5 a 123,7 mg/100g e de 13,6 a 375,0 mg/100g (ácidos), respetivamente.

O teor máximo de açúcares foi determinado para a sacarose na beterraba (8,8 g/100g). Um teor máximo de acidez total foi obtido no alho (8,7 g/100g) que também apresentou o teor máximo de ácido tartárico (2,8 g/100g).

Os açúcares estão maioritariamente presentes nos frutos e os ácidos orgânicos nos hortícolas sendo os ácidos cítrico, tartárico, oxálico e málico os que mais contribuem para a acidez total.

Palavras-chave: Frutos, hortícolas, dados de composição de alimentos, validação de métodos, análise cromatográfica.

Abstract

In this work, the profile and content of sugars (sucrose, glucose, fructose and sorbitol) and organic acids (oxalic, tartaric, lactic, acetic, citric, malic, propionic and ascorbic) were determined by analytical high performance liquid chromatography methods (HPLC) previously validated, in thirty fruit and vegetable products not suitable to the fresh market, due to the need to value them as matrices for energy production and/or extraction of phytochemicals.

The sugars were extracted in water, using *Carrez* solutions for clarification, separated by HPLC-RI in a SugarPak column, with EDTA calcium mobile phase (0.01 mM), flow rate 0.6 mL/min and were identified by retention times. The organic acids were extracted with phosphate buffer, separated and quantified by HPLC-PDA in a reverse phase C18 column, with KH_2PO_4 (0.025 M, pH 2.4) and acetonitrile, 99:1 (V:V) mobile phase, 0.8 mL/min flow rate and detection at 254 nm (ascorbic acid) and 210 nm (other acids).

The validation showed good results in the concentration range of 1.0-30 g/L and 0.01-4.0 g/L, for sugars and organic acids, respectively; presenting correlation coefficients higher than 0.995; good linearity (Mandel test application); repeatability ($\text{CV}_r \leq 4.5\%$); intermediate precision ($\text{CV}_R \leq 9.3\%$) and recovery rates ranged from 78% to 111% for all analytes. The detection and quantification limits ranged from 0.6 to 2.1 g/100g and from 1.7 to 6.4 g/100g (for sugars) and from 4.5 to 123.7 mg/100g and from 13.6 to 375.0 mg/100g (for acids), respectively.

The maximum sugar content determined was for sucrose in beet (8.8 g/100g). Maximum total acidity content was obtained for garlic (8.7 g/100g) which also showed the maximum tartaric content (2.8 g/100g).

Sugars are mostly present in fruits and organic acids in vegetables, being citric, tartaric, oxalic and malic acids contributing most to the total acidity.

Keywords: fruit and vegetables, food composition data, method validation, chromatographic analysis.

Índice geral

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice geral.....	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xii
Significado de abreviaturas, siglas e termos.....	xiii
<i>Capítulo 1</i> REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Objetivos do trabalho.....	3
1.2. Enquadramento do tema	4
1.3. Hortofrutícolas	5
1.3.1. Definição e composição química	5
1.3.2. Mercado atual de hortofrutícolas.....	6
1.4. Hidratos de Carbono	9
1.5. Ácidos orgânicos	12
1.6. Métodos de referência para determinação de açúcares e de ácidos orgânicos	16
1.6.1. Determinação simultânea de açúcares e ácidos orgânicos.....	16
1.6.2. Análise de açúcares	17
1.6.3. Análise de ácidos orgânicos	18
1.7. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	20
1.7.1. Fundamentos teóricos.....	20
1.7.2. Modos de separação.....	24
1.8. Validação de um método analítico de HPLC	25
1.8.1. Parâmetros de validação de métodos analíticos	26
<i>Capítulo 2</i> MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.1. Equipamentos	40
2.2. Materiais	41
2.3. Reagentes	42
2.4. Amostras	44
2.5. Procedimento experimental	46
2.5.1. Preparação de soluções.....	46
2.5.2. Amostragem e preparação das amostras	49
2.5.3. Extração de açúcares e ácidos orgânicos	50
2.5.4. Preparação das amostras para os ensaios de taxa de recuperação	52
2.5.5. Condições cromatográficas.....	52
2.6. Identificação e quantificação dos analitos	53
2.7. Parâmetros de validação do método	54
2.8. Análise estatística e gráfica de resultados.....	56

Capítulo 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1. Ensaios preliminares de análise conjunta de açúcares e ácidos orgânicos.....	62
3.2. Validação dos métodos cromatográficos	63
3.2.1. Validação do método para quantificação de açúcares	63
3.2.2. Validação do método quantificação de ácidos orgânicos	74
3.3. Análise das amostras	86
3.3.1. Análise dos perfis de açúcares e ácidos orgânicos dos hortofrutícolas	87
3.3.2. Análise dos teores de analitos obtidos nos hortofrutícolas.....	91
3.3.2.1. Açúcares	91
3.3.2.2. Ácidos orgânicos.....	94
Capítulo 4 CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO	107
4.1. Conclusões.....	109
4.2. Trabalhos publicados	111
4.3. Trabalho futuro	114
Capítulo 5 BIBLIOGRAFIA	117
ANEXOS.....	127
Anexo 1 - Tabelas da pesquisa bibliográfica.	129
A1.1. Açúcares	129
A1.2. Ácidos orgânicos.....	133
Anexo 2 - Calibração: retas, parâmetros e resíduos.	136
A2.1. Açúcares	136
A2.2. Ácidos orgânicos.....	140
Anexo 3 - Perfil dos analitos nos hortofrutícolas.....	148
Anexo 4 - Folha de cálculo do teste da homogeneidade das variâncias.....	148
A4.1. Açúcares	163
A4.2. Ácidos orgânicos.....	165
Anexo 5- Folha de cálculo para o teste de linearidade (Teste de <i>Mandel</i>)	168
A5.1. Açúcares	168
A5.2. Ácidos orgânicos.....	169
Anexo 6 - Folha de cálculo da repetibilidade e precisão intermédia	170
A6.1. Açúcares	171
A6.2. Ácidos orgânicos.....	175
Anexo 7 - Folha de cálculo do teor de analito e taxa de recuperação.....	179
A7.1. Açúcares	180
A7.2. Ácidos orgânicos.....	182
Anexo 8 - Gráficos do perfil de analitos por grupo de hortifrutícolas	185
Anexo 9 - Intervalo dos teores de analitos por grupo de hortifrutícolas.....	189

Índice de figuras

Figura 1.1 - Culturas permanentes e temporárias em % da área agrícola portuguesa.....	8
Figura 1.2 - Resíduos e subprodutos gerados no processamento fabril de hortofrutícolas.	9
Figura 1.3 - Classificação dos hidratos de carbono.....	9
Figura 1.4 - Estrutura química dos principais açúcares encontrados nos frutos.....	10
Figura 1.5 - Doçura relativa de açúcares em relação à sacarose.....	11
Figura 1.6 - Esquema de separação em cromatografia.....	20
Figura 1.7 - Métodos cromatográficos.....	21
Figura 1.8 - Esquema com os principais componentes de um sistema de HPLC.....	22
Figura 2.1- Preparação de amostras dos hortofrutícolas.....	50
Figura 2.2 - Clarificação de extratos com soluções <i>Carrez</i> para determinação de açúcares.	51
Figura 3.1 - Análise simultânea de açúcares e ácidos orgânicos.....	62
Figura 3.2 - Sobreposição de cromatogramas de açúcares.....	64
Figura 3.3 - Sobreposição dos cromatogramas de padrões mistos de açúcares.....	66
Figura 3.4 - Cromatogramas de padrões individuais de ácidos orgânicos.....	75
Figura 3.5 - Cromatogramas da mistura padrão de ácidos orgânicos.....	76
Figura 3.6 - Perfis cromatográficos do abacaxi.....	87
Figura 3.7 - Teores de sacarose por hortofrutícola analisado.....	92
Figura 3.8 - Teores de glucose por hortofrutícola.....	93
Figura 3.9 - Teores de frutose por hortofrutícola.....	94
Figura 3.10 - Teores de ácido oxálico por hortofrutícola.....	95
Figura 3.11 - Teores de ácido tartárico por hortofrutícola.....	96
Figura 3.12 - Teores de ácido láctico por hortofrutícola.....	97
Figura 3.13 - Teores de ácido acético por hortofrutícola.....	97
Figura 3.14 - Teores de ácido cítrico por hortofrutícola.....	98
Figura 3.15 - Teores de ácido málico por hortofrutícola.....	99
Figura 3.16 - Teores de ácido propiónico por hortofrutícola.....	100
Figura 3.17 - Teores de ácido ascórbico por hortofrutícola.....	100
Figura 3.18 - Teores de acidez total.....	101
Figura 3.19 - Contribuição média de cada ácido para a acidez total.....	102
Figura 3.20 - Contribuição média de cada ácido para a acidez total nos frutos.....	103
Figura 3.21 - Contribuição média de cada ácido para a acidez total nos hortícolas.....	103
Figura 4.1 - Poster apresentado no 5ºPTAAS, IPBeja, 7 de junho de 2019.....	112
Figura 4.2 - Poster apresentado no 6º FÓRUM EQB, ISEL, 7 a 9 de maio de 2019.....	113

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Grupos de hortofrutícolas de acordo com projeto ProEnergy.	5
Tabela 1.2 - Teores de açúcares em g/100g de peso fresco.	12
Tabela 1.3 - Principais ácidos orgânicos predominantes em hortofrutícolas.	14
Tabela 1.4 - Teores de ácidos orgânicos em mg/100g de peso fresco.	16
Tabela 1.5 - Aplicação de HPLC na análise de açúcares com deteção por índice de refração.	18
Tabela 1.6 - Aplicação de HPLC na análise de ácidos orgânicos.	19
Tabela 2.1 - Colunas cromatográficas e especificações do fabricante.	41
Tabela 2.2 - Reagentes utilizados e especificações do fabricante.	43
Tabela 2.3 - Padrões de açúcares e especificações do fabricante.	43
Tabela 2.4 - Padrões de ácidos orgânicos e especificações do fabricante.	44
Tabela 2.5 - Amostras de hortofrutícolas, fornecedor e data de fornecimento em 2019.	45
Tabela 2.6 - Preparação de soluções padrão misto de açúcares.	48
Tabela 2.7 - Preparação de soluções de padrão misto de ácidos.	49
Tabela 2.8 - Concentração de padrão misto adicionada nas amostras.	52
Tabela 2.9 - Condições cromatográficas na determinação de açúcares e ácidos orgânicos.	53
Tabela 2.10 - Procedimentos de validação do método.	55
Tabela 3.1 - Tempos de retenção médio dos padrões de açúcares e desvio padrão.	64
Tabela 3.2 - Valores de PG para avaliação da validade da gama de trabalho.	67
Tabela 3.3 - Retas de calibração, coeficiente de correlação e de determinação dos açúcares.	68
Tabela 3.4 - Resultados do teste de <i>Mandel</i> para avaliação da linearidade nos açúcares.	69
Tabela 3.5 - Sensibilidade do método de determinação de açúcares.	70
Tabela 3.6 - Limites analíticos (g/L) e limites do método (g/100g) de análise dos açúcares.	70
Tabela 3.7 - Desvio padrão e coeficiente de variação de repetibilidade (concentração 10 g/L).	71
Tabela 3.8 - Desvio padrão e coeficiente de variação de repetibilidade (concentração 30 g/L).	72
Tabela 3.9 - Desvio-padrão e coeficiente de variação de precisão intermédia (10 g/L).	72
Tabela 3.10 - Desvio-padrão e coeficiente de variação de precisão intermédia (30 g/L).	72
Tabela 3.11 - Taxas de recuperação para os açúcares em cinco matrizes.	73
Tabela 3.12 - Tempo de retenção médio dos padrões de ácidos orgânicos e desvio padrão.	76
Tabela 3.13 - Gama de trabalho para análise de ácidos orgânicos.	79
Tabela 3.14 - Valores de PG para avaliação da validade da gama de trabalho.	79
Tabela 3.15 - Retas de calibração, coeficiente de correlação e de determinação nos ácidos.	80
Tabela 3.16 - Resultados do teste de <i>Mandel</i> para avaliação da linearidade nos ácidos.	81
Tabela 3.17 - Sensibilidade do método de determinação de ácidos orgânicos.	82
Tabela 3.18 - Limites analíticos e do método de análise dos ácidos orgânicos.	83
Tabela 3.19 - Desvio padrão e coeficiente de variação de repetibilidade (concentrações O4).	83
Tabela 3.20 - Desvio padrão e coeficiente de variação de repetibilidade (concentrações O6).	84
Tabela 3.21 - Desvio padrão e coeficiente de variação de precisão intermédia (O4).	84
Tabela 3.22 - Desvio padrão e coeficiente de variação de precisão intermédia (O6).	85
Tabela 3.23 - Taxas de recuperação dos ácidos orgânicos em cinco matrizes.	86
Tabela 3.24 - Análise dos perfis de analitos por grupos de hortofrutícolas.	88

Significado de abreviaturas, siglas e termos

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APMA	Associação de Produtores de Maçã de Alcobaça
CAMPOTEC	Conservação e Transformação de Hortofrutícolas, SA.
CCF	Cromatografia em camada fina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COOPERFRUTAS	Cooperativa de Produtores de Frutos e Produtos
DGS	Direção Geral da Saúde
ECD	Detetor eletroquímico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EN	Norma europeia
EP	<i>European Pharmacopoeia</i>
EU	<i>European Union</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRUBAÇA	Cooperativa de Hortofrutícolas
GC	Cromatografia gasosa
GPP	Gabinete de Planeamento e Projetos
GRANFER	Produtores de frutas, CRL
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I&D	Investigação e Desenvolvimento
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
IEC	<i>International Eletrotechnical Comission</i>
INE	Instituto Nacional de Estatística
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IP	Instituto Público
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IR	Índice de refração

IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
ISA	Instituto Superior de Agronomia
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JAOAC	<i>Journal of Association of Official Analytical Chemists</i>
LC	Cromatografia líquida
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação
MADRP	Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas.
MS	Espectrometria de massa
NP-HPLC	HPLC em fase normal
p.a.	Grau pró-análise
PDA	Detetor de arranjo de diodos
PDR2020	Plano Diretor Regional 2020
p/V	Peso por volume
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Relacre	Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
RI	<i>Refractive index</i>
RP-HPLC	HPLC em fase reversa
rpm	Rotações por minuto
S	Desvio padrão
SE	Erro padrão
t _r	Tempo de retenção
UHPLC	<i>Ultra-high performance liquid chromatography</i>
US-FDA	<i>United State of America – Food and Drug Administration</i>
UTI	Unidade de Tecnologia e Inovação
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Objetivos do trabalho

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento, validação e aplicação de métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação do teor de açúcares e de ácidos orgânicos em amostras de subprodutos hortofrutícolas de baixo valor económico, por não serem adequados para o mercado em fresco os quais, no texto deste trabalho serão designados apenas por hortofrutícolas.

O trabalho decorreu no Laboratório de Química da Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), no Pólo de Oeiras, no âmbito do projeto *ProEnergy* (PDR2020-101-031856).

O trabalho envolveu:

- A escolha de trinta amostras de subprodutos hortofrutícolas, que ocorreu de acordo com a disponibilidade dos produtos em termos de época e possibilidade de fornecimento pelas entidades parceiras do projeto, produtores e mercados locais;
- A seleção e otimização dos métodos de extração de açúcares e de ácidos orgânicos nas matrizes em estudo;
- A seleção, otimização e validação dos métodos de HPLC e sua aplicação nos hortofrutícolas em estudo;
- A determinação do perfil de açúcares e de ácidos orgânicos nos hortofrutícolas;
- A quantificação do teor de açúcares e ácidos orgânicos predominantes nos hortofrutícolas.

1.2. Enquadramento do tema

Açúcares e ácidos orgânicos são compostos amplamente representados nos hortofrutícolas constituindo os seus principais sólidos solúveis. Estes compostos apresentam diferentes funcionalidades nas características organoléticas, doçura e textura, bem como, um papel importante na conservação dos alimentos. Além disso, a concentração de ácidos ou de açúcares individuais e suas proporções relativas pode ser um parâmetro de qualidade em produtos como sumos de fruta, permitindo a verificação da sua autenticidade (Andrés *et al.*, 2015).

Ao nível industrial a maior parte dos hortofrutícolas é vendido em fresco, no entanto, o seu processamento leva ao descarte de cerca de 10% a 20% da matéria-prima laborada, gerando subprodutos e resíduos enviados para destinos de baixo valor económico, como por exemplo, a compostagem e a alimentação animal (Raimundo, 2018), levando à necessidade de novos métodos de valorização económica destes subprodutos e resíduos hortofrutícolas.

O projeto *ProEnergy* (PDR2020-101-031856) em execução no INIAV, no ano de 2019, tem como objetivo principal a gestão de resíduos orgânicos e valorização de subprodutos e resíduos agro-alimentares, através do desenvolvimento de novos produtos de valor acrescentado e/ou da conversão bioenergética. Fazem parte deste projeto as Instituições de Investigação e Desenvolvimento (I&D): Instituto Superior de Agronomia (ISA) (promotor), INIAV e Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL); as empresas: Conservação e Transformação de Hortofrutícolas, SA (CAMPOTEC); Produtores de Frutas, CRL (GRANFER); Cooperativa de Hortofrutícolas (FRUBAÇA) e Cooperativa de Produtores de Frutos e Produtos (COOPERFRUTAS); e ainda a Associação de Produtores Maçã Alcobaça (APMA).

Tanto para o desenvolvimento de novos produtos como para a sua valorização energética é necessária a quantificação dos constituintes destes subprodutos e resíduos hortofrutícolas, tornando essencial o desenvolvimento e validação de métodos analíticos fiáveis e robustos que permitam a determinação desses compostos neste tipo de matrizes complexas.

1.3. Hortofrutícolas

1.3.1. Definição e composição química

São designados por hortofrutícolas frutos e vegetais em fresco, ou seja, na sua forma natural sem sofrer qualquer transformação, entretanto no contexto do presente trabalho, serão designados por hortofrutícolas frutos e vegetais de baixo valor económico, por não serem adequados para o mercado em fresco. De acordo com o projeto ProEnergy esta classe de alimentos subdivide-se em hortaliças, legumes e frutos, como indicado na Tabela 1.1. O grupo das hortaliças pode subdividir-se em hortaliças folhosas e ervas aromáticas, os frutos podem ser hortícolas ou não hortícolas e os legumes incluem as raízes, bolbos, tubérculos e os frutos hortícolas. Nos frutos não hortícolas existe ainda a subdivisão em citrinos (frutos cítricos como laranja e limão), pomóides (frutos de pomar como maçã e pera), prunóides (frutos com caroço como ameixa e pêssago) e tropicais (abacaxi e banana).

Tabela 1.1 - Grupos de hortofrutícolas de acordo com projeto ProEnergy.

Grupos	Tipos de hortofrutícolas	Estrutura botânica
Hortaliças (folhosas)	Alfaces, canónigos, aromáticas, agrião, brócolos e espinafre.	Folhas
Legumes	Cenoura, nabo, beterraba, cebola, alho francês, gengibre e batatas de várias espécies.	Raízes, bolbos e tubérculos
Frutos	Abacaxi, uva, maçã, pera e meloa.	Frutos não hortícolas
Legumes (Outros frutos)	Pepino, pimento, beringela, curgete, tomate	Frutos hortícolas

Projeto ProEnergy - PDR2020-101-031856

Estes alimentos são fontes insubstituíveis de hidratos de carbono, minerais, compostos bioativos, como compostos fenólicos, vitaminas, ácidos orgânicos e fibras alimentares (Mahmood *et al.*, 2012).

Os produtos hortícolas fornecem, geralmente, quantidades relativamente reduzidas de calorias, têm elevado valor nutricional e portanto são essenciais para a prática de

hábitos alimentares saudáveis (DGS, 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (DGS, 2005), o baixo consumo de hortofrutícolas é responsável por grande parte das carências de vitaminas no organismo humano e pelo aumento do risco de várias doenças.

Os açúcares e os ácidos orgânicos estão amplamente distribuídos nos hortofrutícolas e são componentes importantes por serem responsáveis pelo sabor e manutenção da qualidade (Andrés *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2012). A natureza e a concentração destes compostos variam de acordo com o grau de maturação e são de grande importância devido à influência que têm nas propriedades organoléticas dos hortofrutícolas causando grande impacto na comercialização do produto (Zheng *et al.*, 2016). Nas propriedades organoléticas, o sabor é devido ao balanço entre: o sabor doce (regulado pelos açúcares livres); o sabor ácido (regulado pelos ácidos orgânicos predominantes) e a adstringência (regulada pela existência de polímeros de flavonóides como as proantocianidinas ou taninos condensados), sendo o aroma devido à concentração de compostos voláteis com odor (como esteres, álcoois, aldeídos e cetonas de baixo peso molecular, bem como os ácidos orgânicos voláteis: acético, propiónico e butírico). Importa ainda referir que a combinação de minerais (cálcio, fosforo e potássio) com os ácidos orgânicos influencia a capacidade tampão e a percepção da acidez nos frutos (Kader, 2008).

Em trabalhos publicados tem sido bastante utilizada uma correlação entre sólidos solúveis e poder edulcorante, que no entanto é baixa, pois além dos açúcares, os sólidos solúveis incluem ácidos orgânicos, pectinas solúveis, antocianinas e outros fenólicos, como o ácido ascórbico, que não são contabilizados nessa correlação (Kader, 2008). Açúcares solúveis e ácidos orgânicos são também importantes por contribuírem, ainda que indiretamente, para o metabolismo fenólico, por um lado, devido a alterações do pH provocadas pelos ácidos e por outro, devido a combinações que ocorrem entre compostos fenólicos e moléculas de açúcar (Kader, 2008).

1.3.2. Mercado atual de hortofrutícolas

Os frutos, os legumes e as hortaliças são alimentos apreciados em todo o mundo e o seu consumo nos países europeus está em ascensão na última década. Estes

produtos são ótimas fontes de vitaminas, minerais e hidratos de carbono, contribuindo para uma dieta saudável e equilibrada, existem ainda pesquisas que apontam que a ingestão destes alimentos diminui o risco de mortalidade e de diversas doenças (DGS, 2005).

A China é líder na produção mundial de hortofrutícolas, seguida da Índia, Brasil, Indonésia, Filipinas, Estados Unidos, Turquia, México, Irão e Espanha (Santos, 2013).

Portugal, por ser um país de pequena dimensão territorial, é um dos menores produtores agrícolas da União Europeia, possuindo cerca de 7,5% da sua superfície utilizada para a atividade agrícola de culturas permanentes e não permanentes, com geração de empregos diretos e indiretos (INE, 2018). A produção de hortofrutícolas em fresco está concentrada na faixa litoral do país, com as zonas produtoras de entre Douro e Minho e sobretudo a do Alentejo, a ganhar importância crescente, devido às condições naturais extremamente favoráveis como as existentes na região do Sudoeste Alentejano (GPP, MADRP, 2007).

De acordo com dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), em 2018 foram produzidas 2.351.853 toneladas de hortofrutícolas entre estes batata, culturas hortícolas, frutos frescos, frutos de pequena baga, frutos subtropicais e citrinos ocupando 1.287 hectares de terra.

Em 2018 cerca de 61% da área agrícola foi ocupada com culturas permanentes (frutos frescos, frutos de casca rija e subtropicais, frutos de pequena baga, citrinos, olival e vinha) e 39% com culturas temporárias, onde se incluem os hortícolas. Nas culturas permanentes, 11% respeitava aos frutos frescos, 5% aos citrinos e 1% aos frutos de pequena baga; quanto às culturas temporárias, os hortícolas representavam 19% e a batata 30% (INE, 2018). Pode observar-se na Figura 1.1. a distribuição de culturas permanentes e temporárias pela área cultivada em Portugal.

Relativamente às culturas por região, destacam-se as regiões do Ribatejo e do Oeste, pelas culturas hortícolas (60%), da batata (31%) e dos frutos frescos (54%); a do Algarve, devido às explorações de citrinos (85%) e a região do Douro e Minho, pela produção de frutos subtropicais (47%), sendo as percentagens indicadas determinadas em relação à produção total do país (INE, 2018).

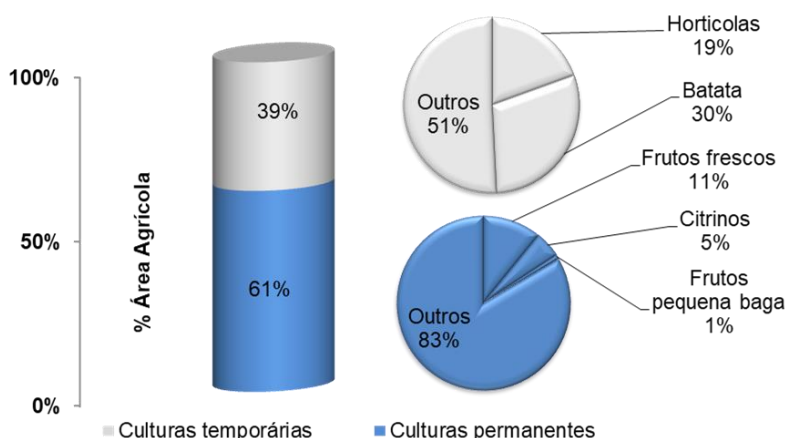


Figura 1.1- Culturas permanentes e temporárias em % da área agrícola portuguesa (dados INE, 2018).

Na agricultura portuguesa a produção vegetal tem maior peso, em termos financeiros, do que a produção animal e gerando cerca de 2.869 milhões de euros provenientes do cultivo de produtos hortícolas, batatas e frutos em que os frutos representam a maior parcela (INE, 2018). Dos produtos hortofrutícolas produzidos as peras, maçãs, kiwis, tomate, cebola, couve e batata doce são os mais exportados (INE, 2018).

De acordo com a Organização das Nações Unidas cerca de um terço dos alimentos produzidos globalmente, são perdidos ou desperdiçados. Esse montante representa cerca de 1,3 bilhões de toneladas/ano que vão desde a produção agrícola, manuseamento pós-colheita e processamento alimentar (Gustavsson *et al.*, 2011).

Na Europa as atividades de processamento alimentar produzem elevadas quantidades de subprodutos e resíduos na ordem das 2500 toneladas por ano (Federici *et al.*, 2009). No caso do processamento de hortofrutícolas a maior parte segue para o mercado em fresco mas cerca de 10 a 20% dos produtos processados são descartados (Raimundo, 2018), gerando resíduos e subprodutos tal como se pode observar na Figura 1.2.

O aproveitamento destes subprodutos e resíduos inclui a alimentação animal, a incineração e a compostagem. Contudo, os produtos descartados, principalmente os provenientes das centrais hortofrutícolas, possuem elevada quantidade de nutrientes e compostos bioativos com elevado potencial fitoquímico e/ou energético, tornando-se necessário a criação de novos processos que atribuam alto valor acrescentado a este tipo de subprodutos e resíduos, de modo a reaproveitar os compostos bioativos

para aplicações na indústria alimentar e/ou farmacêutica ou como substratos energéticos na produção de bioenergia, objetivos que fazem parte do projeto *ProEnergy*.



Figura 1.2 - Resíduos e subprodutos gerados no processamento fabril de hortofrutícolas (Lageiro *et al.*, 2019).

1.4. Hidratos de Carbono

Os açúcares pertencem ao grupo dos hidratos de carbono e são aldeídos poli-hidroxilados, cetonas poli-hidroxiladas ou compostos que, por hidrólise, se podem transformar nos anteriores. Os hidratos de carbono podem dividir-se em simples e complexos como apresentado na Figura 1.3 (Voet *et al.*, 1999 e Lee *et al.*, 1970). Os simples podem ser divididos em monossacáridos (glucose, frutose, galactose), dissacáridos (maltose, sacarose, lactose) e álcoois de açúcar (sorbitol e manitol). Os complexos dividem em oligossacáridos (rafinose, estaquiose, inulina) e polissacáridos (glicogénio, amido, fibras dietéticas) (Lee *et al.*, 1970).

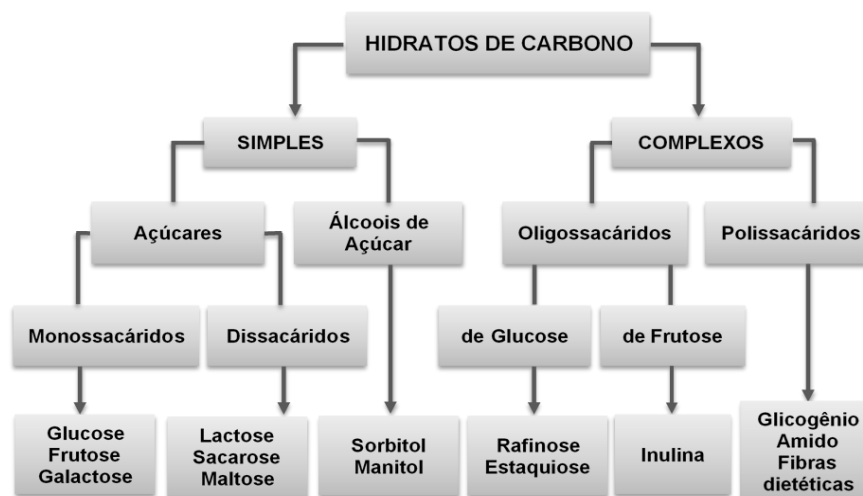


Figura 1.3 - Classificação dos hidratos de carbono (adaptado de Voet *et al.*, 1999).

Os hidratos de carbono são utilizados para o consumo humano, como fonte de energia, estão presentes em alimentos e bebidas, ajudam a manter unidos ingredientes de produtos alimentícios e farmacêuticos devido às suas propriedades de adesividade e viscosidade em solução e são também utilizados como conservantes em alimentos (Figueiredo, 2012).

Os açúcares simples são responsáveis pelo sabor doce nos hortofrutícolas, e são uma das principais fontes de energia na alimentação humana (DGS, 2005), podendo ser encontrados principalmente em frutos e sumos, ou como aditivos em alimentos e bebidas (Rodrigues, 2016).

O facto dos açúcares não possuírem cromóforos na sua estrutura, aliado à grande similaridade entre as várias moléculas que os constituem (muitas são isómeros) torna complicada a análise destes compostos (Fountain *et al.*, 2009).

A glucose, frutose e sacarose, constituem os mono e dissacáridos predominantes nos hortofrutícolas e nos órgãos de armazenamento de energia das plantas (Georgelis *et al.*, 2018), compostos cuja estrutura química se encontra representada na Figura 1.4.

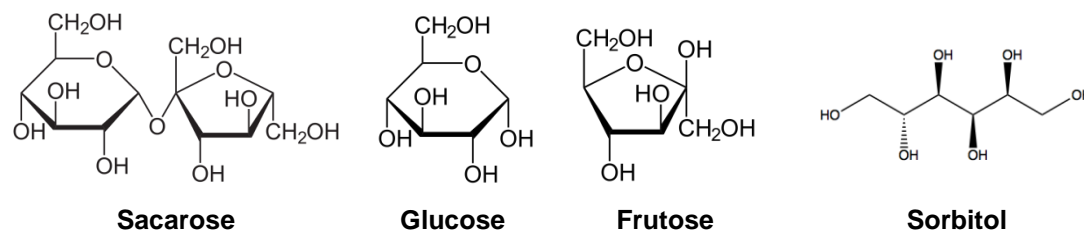


Figura 1.4 - Estrutura química dos principais açúcares encontrados nos frutos (adaptado de Voet *et al.*, 1999 e Stryer, 1992).

A sacarose é o açúcar mais consumido em todo o mundo principalmente sob a forma de cristais (açúcar de mesa) embora possa também ser encontrado sob a forma líquida. É o dissacárido que está presente em abundância na cana-de-açúcar, na beterraba e nos citrinos (Figueiredo, 2012; Karadeniz, 2004 e Zheng *et al.*, 2016).

A glucose é um dos principais produtos da fotossíntese e por isso este monossacárideo está presente nos produtos hortícolas em geral (Figueiredo, 2012). Apesar da frutose ser conhecida como o açúcar dos frutos, é a glucose que está normalmente presente em maior quantidade nestes, com exceção dos frutos

pomóides nos quais a frutose é predominante (Sequeira, 2012). Ambos estão fortemente presentes nas uvas e são a base química do vinho.

Nos hortofrutícolas a proporção entre a frutose e a glucose é geralmente de 1:1, mas um elevado quociente frutose/glucose, como no caso dos frutos pomóides, pode ocasionar problemas intestinais devido à menor afinidade de absorção da frutose pelo organismo relativamente à da glucose e sacarose. Daí que em vários estudos de açúcares em hortofrutícolas e sumos este quociente seja mencionado (Muir *et al.*, 2009 e Sequeira, 2012).

O sorbitol é um álcool de açúcar produzido por hidrogenação da glucose, é solúvel em água e ocorre naturalmente em frutos e vegetais proporcionando doçura e textura. No campo da nutrição humana há interesse crescente por frutas ricas em sorbitol, uma vez que esse álcool de açúcar é benéfico no controle da dieta, na saúde bucal e na prevenção de problemas gastrointestinais, sendo ainda, bastante utilizado na indústria alimentar como edulcorante (Font i Forcada *et al.*, 2013).

Cada um destes hidratos de carbono apresenta uma doçura (poder edulcorante) determinada em relação à sacarose na seguinte ordem: frutose (1,2) > sacarose (1,0) > glucose (0,74), (Kader, 2008), como apresentado na Figura 1.5. A doçura da frutose é percebida antes de sacarose ou da glucose e a sensação no paladar atinge um pico (maior que o da sacarose) e diminui mais rapidamente do que a sacarose. O poder edulcorante da frutose tem também um efeito sinérgico em relação aos outros açúcares fazendo com que quando ingeridos em conjunto com a frutose a sensação doce no paladar seja superior à dos açúcares em separado (Kader, 2008).

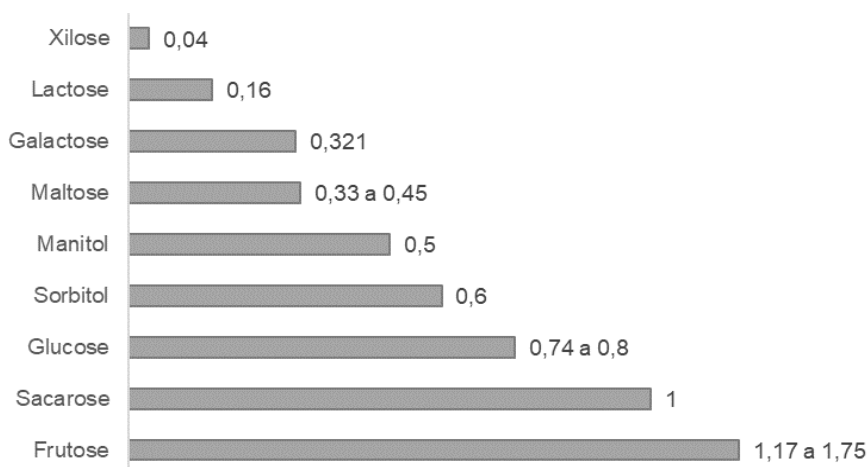


Figura 1.5 - Doçura relativa de açúcares em relação à sacarose (adaptado de Kader, 2008).

Alguns hortofrutícolas que apresentam sacarose na sua composição possuem também glucose e frutose em maior ou menor quantidade, esses açúcares juntos conferem sabor doce e inibem o crescimento de microrganismos quando em maiores concentrações. Trabalhos relevantes da literatura reportam as concentrações de açúcares determinadas em diversos produtos hortofrutícolas, apresentando-se na Tabela 1.2 uma compilação das referências em que os autores determinaram os teores de sacarose, glucose, frutose e sorbitol em matrizes vegetais. Para além dos dados apresentados na Tabela 1.2 os níveis de sorbitol foram estudados por Jovanovic-Malinovska *et al.* (2014) em trinta e duas matrizes hortofrutícolas, entre os quais se destacam a rúcula (0,28 g/100g), brócolos (0,20 g/100g), amoras (3,15 g/100g) e nectarinas (1,08 g/100g).

Tabela 1.2 - Teores de açúcares em g/100g de peso fresco.

Amostra	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol	Referência
Banana	6,85	3,50	3,11	-	(a)
Beterraba	6,64	0,08	0,12	-	(b)
Cenoura	4,24	0,92	0,94	-	(b)
Maçã	5,73	3,47	2,27	0,68	(c)
Nectarina	5,27	1,49	1,53	1,32	(d)
Pêra	2,44	4,21	4,50	2,45	(c)
Pêssego	6,20	0,58	0,57	-	(a)
Tomate	0,17	1,66	1,28	ND	(c)
Toranja	2,68	1,38	1,71	ND	(e)

(ND) não detetado, (-) não analisado, (a) Pérez *et al.* (1997) (b) Lee *et al.* (1970) (c) Jovanovic-Malinovska *et al.* (2014), (d) Aubert *et al.* (2014), (e) Zheng *et al.* (2016).

1.5. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são essenciais para o metabolismo respiratório, atuam como compostos de reserva nas plantas e estão amplamente distribuídos nos hortofrutícolas (Andrés *et al.*, 2015). Podem ser classificados de acordo com o tipo de cadeia (alifática, alicíclica, aromática, heterocíclica), grau de insaturação (saturada ou insaturada) e quanto ao número de grupos funcionais que contém (monocarboxílico, dicarboxílico, etc). Os ácidos alifáticos monocarboxílicos até quatro átomos de carbono são líquidos, solúveis em água e altamente voláteis; os

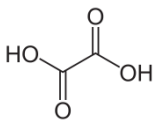
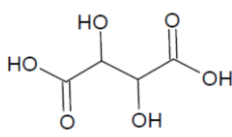
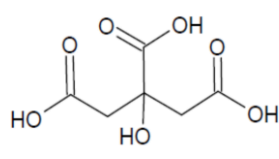
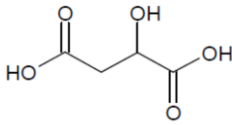
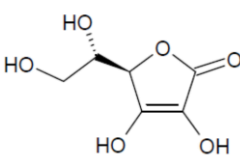
de quatro a oito átomos de carbono têm odores desagradáveis; a partir de cinco átomos de carbono tornam-se viscosos e pouco solúveis e os ácidos orgânicos com mais de 10 átomos de carbonos são ácidos gordos (Stryer, 1992). Os ácidos orgânicos são caracterizados pela presença do grupo funcional (-COOH) na sua estrutura (Rodrigues, 2016), tornando-os ácidos fracos com baixo valor da constante de dissociação (pK_a). O pH é um parâmetro importante a ser considerado na análise destes ácidos pois influencia o grau de ionização do ácido, de modo que, para evitar a ionização dos ácidos presentes nas amostras durante a separação cromatográfica, o pH da fase móvel deve ser menor do que a constante de dissociação ácida do ácido orgânico a analisar (Lu *et al.*, 2015).

A determinação de ácidos orgânicos em produtos hortofrutícolas é de grande importância pois estes resultam de processos de síntese das plantas e influenciam o sabor, aroma, cor, estabilidade e manutenção da qualidade, possuindo ainda, propriedades antioxidantes benéficas à saúde humana (Andrés *et al.*, 2015). A acidez indica o sabor ácido ou azedo dos frutos e é representada pela concentração dos ácidos orgânicos. Com poucas exceções, as hortaliças possuem baixa acidez, tornando-se mais suscetíveis à deterioração por bactérias (Paschoalino, 1997). A concentração dos ácidos varia com diversos fatores, tais como, a espécie de hortofrutícola, o solo, a época da colheita, o tempo de prateleira e as condições de *stress* a que são submetidos (Scherer *et al.*, 2012 e Andrés *et al.*, 2015).

Os principais ácidos orgânicos encontrados nos frutos são o cítrico, ascórbico, tartárico e málico, representados na Tabela 1.3. Apesar destes ácidos serem os predominantes existem outros em menor concentração, como o acético, láctico, propiônico, oxálico, que também são importantes (Damodaram *et al.*, 2010 e Rodrigues, 2016).

A grande maioria dos frutos e hortaliças tem características ácidas, tendo os frutos maior acidez. Os teores e tipo de ácidos variam muito e assim, por exemplo, em milho verde a acidez é baixa, mas em groselhas, amoras ou espinafres é muito alta no entanto inferior à acidez dos frutos considerados ácidos como o limão e a lima que contêm até 3% de acidez em peso fresco total (Rodrigues, 2016).

Tabela 1.3 - Principais ácidos orgânicos predominantes em hortofrutícolas (Damodaram *et al.*, 2010 e Walker e Famiani, 2018).

Ácido	Estrutura química	Hortofrutícolas
Oxálico		Carambola, ruibarbo, framboesa, ameixa, goji, abacaxi, cereja e tomate
Tartárico		Abacate, uva e citrinos
Cítrico		Limão, laranja, pêssego, pera, abacaxi, morango, romã, ervilhas, couve branca, beterraba, folhosas e batata.
Málico		Maçã, banana, cereja, pêssego, uva, ameixa, pera, cebola, cenoura, brócolos e feijão verde
Ascórbico		Kiwi, laranja, limão e pimentos

O ácido oxálico é um importante antioxidante natural, que desempenha uma função essencial no sistema imunológico, sendo um forte aliado na prevenção de doenças como o cancro. Está presente em diversos hortofrutícolas, principalmente nas folhas dos vegetais, tais como nas folhas da beterraba, na acelga suíça, espinafre e ruibarbo, sendo este último o mais conhecido por conter altos teores de ácido oxálico. No entanto, o excesso deste ácido está associado ao aparecimento de pedras nos rins, bem como o impedimento de absorção de minerais no intestino o que torna importante a determinação dos teores deste ácido em alimentos (Walker e Famiani, 2018).

O ácido tartárico é um componente natural das uvas, amoras, groselhas e arandos; atua influenciando o pH, é resistente à respiração oxidativa e proporciona sabor forte e amargo aos produtos em que está presente (Rodrigues, 2016 e Sequeira, 2012).

O ácido cítrico é considerado um conservante natural e portanto é adicionado a alimentos e bebidas para conferir o sabor ácido (Xie *et al.*, 2011). Este ácido é o que

mais contribui para o sabor ácido em citrinos e representa 79, 71 e 45 % do total de ácidos orgânicos em lima, limão e laranja, respetivamente (Zheng *et al.*, 2016).

O ácido málico é também encontrado naturalmente nos frutos, sendo o segundo mais frequente depois do cítrico. Encontra-se em frutos cítricos e pomóides e também em células do corpo humano onde atua estimulando o metabolismo para o aumento da produção de energia. É o acidulante preferido em bebidas de baixas calorias e em sumos de maçã pois melhora o sabor e estabiliza a cor em sumos de frutos (Rodrigues, 2016 e Sequeira, 2012).

O ácido ascórbico ou vitamina C, como é vulgarmente conhecido, é um ácido fenólico não sintetizado pelo corpo humano e por isso é exclusivamente fornecido pela ingestão de alimentos que o contém, como frutos e legumes, sendo uma vitamina de consumo essencial uma vez que a sua carência pode ocasionar algumas doenças como por exemplo o escorbuto (Campbell, 2003).

Tal como para a doçura dos açúcares que toma como referência o poder edulcorante da sacarose, existe uma escala de acidez para os ácidos orgânicos que usa como referência a acidez do ácido cítrico (1,0) > málico (0,9) > tartárico (0,8) > aspártico e glutâmico (Kader, 2008).

Os ácidos orgânicos são usados na indústria alimentar como aditivos em bebidas à base de frutas e bebidas alcoólicas devido à sua ação conservante (Barros *et al.*, 2007) pois possuem poder antioxidante, antimicrobiano, acidulante e estabilizante. São frequentemente usados como acidulantes para manter a estabilidade microbiana (Raimundo, 2018); sendo os mais utilizados o cítrico, ascórbico, tartárico e málico. Os ácidos orgânicos são ainda capazes de estabilizar pigmentos e prolongar a vida de prateleira de frutos frescos e dos seus respetivos produtos processados (Martínez-Madrid *et al.*, 2018). Trabalhos relevantes da literatura reportam as concentrações de ácidos orgânicos, determinadas em diversos produtos hortofrutícolas, apresentando-se na Tabela 1.4 uma compilação das referências em que os autores determinaram os teores dos ácidos oxálico, tartárico, cítrico, málico e ascórbico em matrizes vegetais.

Tabela 1.4 - Teores de ácidos orgânicos em mg/100g de peso fresco.

Amostra	Oxálico	Tartárico	Cítrico	Málico	Ascórbico	Referência
Laranja	-	-	980	200	75	(a)
Limão	-	-	4000	260	50	(a)
Abacaxi	-	-	560	330	29	(b)
	5,1	-	-	-	-	(c)
Tomate	-	-	505	100	-	(d)
	3,2	-	-	-	-	(c)
Cereja	-	8	-	-	-	(e)
	-	-	7	850	17	(f)
	6,3	-	-	-	-	(c)

(-) não analisado, (a) Walker e Famiani (2018), (b) Leonel *et al.* (2014), (c) Nguyễn e Savage (2013), (d) Xu *et al.* (2014), (e) Mahmood *et al.* (2012), (f) Girard e Kopp (1998).

1.6. Métodos de referência para determinação de açúcares e de ácidos orgânicos

Os principais métodos de referência para determinação de açúcares e de ácidos orgânicos são métodos cromatográficos por HPLC de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (Horwitz, 1980) e as normas ISO, *International Organization for Standardization*. Para a determinação de açúcares existem normas ISO para análise de leites e derivados (ISO 22662:2007, 2007), bem como, os métodos oficiais de análise AOAC 980.13 (1990) e para análise de xaropes a ISO 10504:2013 (2013). Para determinação de ácidos orgânicos em sumos de frutos é aplicado o método AOAC 986.13 (1986) que aplica HPLC em fase reversa com duas colunas C18 em série.

1.6.1. Determinação simultânea de açúcares e ácidos orgânicos

Embora exista necessidade de desenvolver métodos analíticos para a determinação simultânea de açúcares e ácidos orgânicos presentes nas matrizes alimentares, são poucos os trabalhos desenvolvidos que aplicam estas determinações em simultâneo e os que existem mencionam colunas de HPLC como a Aminex HPX (Kelebek *et al.*, 2009) e a Rezex ROA (Saidani *et al.*, 2017).

Costa e colaboradores em 2016 utilizaram uma coluna *Aminex* HPX-87H numa experiência de fermentação de lactose com produção de ácidos orgânicos com detetor de índice de refração (IR) para os açúcares e detetor de arranjo de díodos (PDA) para os ácidos. Outros autores, Aubert *et al.* (2014) e Saidani *et al.* (2017), utilizaram o mesmo método com uma coluna *Rezex* ROA com os detetores IR e PDA em série para a determinação simultânea destes compostos. Zaky *et al.* (2017) conseguiu a separação destes compostos em simultâneo utilizando uma coluna de *HI-Plex* H a 35 °C, com H₂SO₄ (0,005 M) como fase móvel e um caudal de 0,4 mL/min. O eluente da coluna foi monitorizado por um detetor IR que detetou açúcares, ácidos orgânicos e álcoois.

A análise simultânea de açúcares e ácidos orgânicos, foi também realizada por Lu e colaboradores (2015), numa separação com uma coluna NH₂, usando como fase móvel uma solução aquosa de acetonitrilo (ACN) 75 %, a pH 2,20 ajustado com H₃PO₄, com um fluxo de 1,0 mL/min. A proporção ACN/água desempenhou um papel fundamental na retenção dos açúcares e ácidos orgânicos tendo sido testada a gama de 60 a 90 %. Os detectores utilizados foram o PDA (com integração a 210 nm) para a quantificação de ácidos orgânicos e IR a 35 °C para a determinação de monossacáridos, com os detectores ligados em série.

1.6.2. Análise de açúcares

Diversos métodos analíticos têm sido reportados na literatura para a análise quantitativa dos hidratos de carbono (sacarose, glucose e frutose) em alimentos (Georgelis *et al.*, 2018). Os métodos físico-químicos clássicos conhecidos para a análise destes açúcares podem ser agrupados em métodos de titulação, gravimétricos e espectrofotométricos (Silva *et al.*, 2003).

Contudo, os métodos mais utilizados são aqueles que envolvem técnicas cromatográficas por serem mais rápidos, seletivos, precisos e sensíveis (Rodrigues, 2016). São exemplos, o HPLC (Molnár-Perl, 2000), a cromatografia em camada fina (CCF) (Jovanovic-Malinovska *et al.*, 2014) e a cromatografia gasosa (GC) (Georgelis *et al.*, 2018), no entanto, na análise de açúcares as técnicas de GC exigem derivatização o que torna a análise demorada (Georgelis *et al.*, 2018). Na Tabela 1.5

referem-se três das publicações mais recentes que reportam aplicação de métodos de HPLC para determinação de açúcares em frutos.

Tabela 1.5 - Aplicação de HPLC na análise de açúcares com detecção por índice de refração.

Referência	Wilson e Downs, 2012	Zheng <i>et al.</i> , 2016	Choi <i>et al.</i> , 2015
Matriz	Anona, figo, etc.	Toranja	Pêra
Analito	Sacarose, glucose e frutose	Sacarose, glucose, frutose e sorbitol	Sacarose, glucose, frutose e sorbitol
Coluna	RCM-Monossacárido <i>Rezex</i>	Carbohidratos <i>ZORBAX</i>	<i>Sugar-Pak Waters</i>
Fase Móvel	Água	ACN:água (80:20, v/v)	Água
Deteção	IR	IR	IR

ACN-Acetonitrilo, IR-Índice de refração.

As principais dificuldades existentes na determinação e identificação de açúcares em matrizes alimentares consistem: i) na utilização maioritária de sistemas de detecção universais e menos sensíveis como a detecção por índice de refração (IR); ii) na necessidade de derivatização da amostra para que possam ser aplicados métodos de detecção mais sensíveis como fluorescência ou ultravioleta (Goeij, 2013); iii) no recurso a técnicas de espectrometria de massa (Georgelis *et al.*, 2018). Existe ainda a possibilidade de utilização de um detetor eletroquímico (ECD) que não requer derivatização e a sensibilidade é maior do que a do detetor IR (Georgelis *et al.*, 2018).

1.6.3. Análise de ácidos orgânicos

Vários métodos têm sido relatados na literatura para a quantificação de ácidos orgânicos, tais como espectrofotometria, técnicas de titulação, eletroforese capilar e métodos cromatográficos como HPLC que se tornou cada vez mais popular para a análise de misturas de ácidos orgânicos devido ao desempenho, simplicidade, velocidade e estabilidade do método (Scherer *et al.*, 2012).

Pelo facto dos ácidos orgânicos terem baixo peso molecular e funcionalidades polares, a fase móvel mais usada é um tampão aquoso. Uma solução tampão com

pH baixo é utilizada para assegurar que todos os grupos ácidos estão protonados, permitindo assim uma melhor interação entre os ácidos orgânicos e a fase estacionária C18. No entanto, a utilização uma fase móvel 100 % aquosa pode fazer com que colunas C18 convencionais entrem em colapso, resultando em perda de retenção. Para restabelecer a estrutura da cadeia e desempenho da coluna é necessário proceder à lavagem com fase móvel orgânica que é um passo demorado (Kowalski, 2019).

Sena Aquino *et al.* (2015) comparou métodos de cromatografia líquida e eletroforese capilar para a identificação e quantificação de ácidos orgânicos, em vinhos, identificando os ácidos láctico, acético, propiónico e butírico por HPLC com uma coluna de fase reversa C18, detetor de arranjo de díodos a comprimento de onda de 220 nm, usando como fase móvel KH_2PO_4 (0,02 M) a pH 2,9, não obtendo diferenças significativas entre os métodos em termos de desempenho analítico. No entanto, a eletroforese capilar apresentou vantagens em comparação com o método de HPLC em termos económicos, ao utilizar menor volume de efluente e necessitar de menor tempo de análise (< 2 min).

Na Tabela 1.6 apresentam-se publicações recentes que referem métodos de HPLC para a determinação de ácidos orgânicos em frutos.

Tabela 1.6 - Aplicação de HPLC na análise de ácidos orgânicos.

Referência	Leonel <i>et al.</i> , 2014	Zheng <i>et al.</i> , 2016	Saidani <i>et al.</i> , 2017
Matriz	Abacaxi	Toranja	Pêssego
Analito	Ácido cítrico, ascórbico e málico	Ácido oxálico, tartárico, málico quinínico e cítrico	Ácido málico, quínico e cítrico
Coluna	<i>Aminex</i> HPX-87H	ODS C18	<i>Rezex</i> ROA H ⁺
Fase móvel	H_2SO_4 (0,005 M)	Fosfato diamônico	H_2SO_4 (0,005 M)
Deteção	PDA	PDA	PDA

PDA - Detetor de arranjo de díodos.

1.7. Cromatografia líquida de alta eficiência

1.7.1. Fundamentos teóricos

A cromatografia é um método físico-químico de separação, que consiste na migração diferencial dos componentes de uma mistura, devido às diferentes interações que estabelecem com duas fases imiscíveis, sendo uma fixa, denominada fase estacionária (presente na coluna) e outra móvel designada por fase móvel, (fluido que se desloca através da coluna) que arrasta a mistura a analisar. Os componentes da amostra vão sendo separados a medida que atravessam a coluna (Neto e Nunes, 2003), como ilustrado na Figura 1.6.

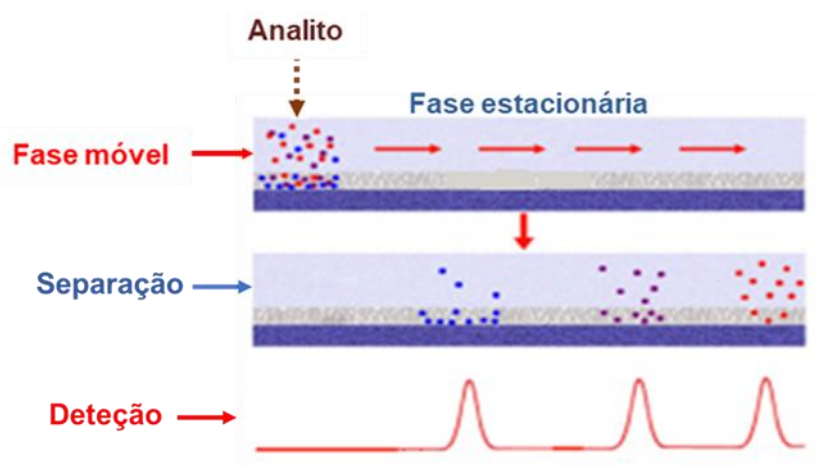


Figura 1.6 - Esquema de separação em cromatografia (adaptado de *Phenomenex*, 2018).

O termo cromatografia foi empregado pela primeira vez, em 1906 pelo botânico russo Mikhael Semenovitch Tswett que descreveu as suas experiências de separação dos componentes de extratos de folhas. Mikhael foi o primeiro a compreender e interpretar este procedimento tal como é descrito atualmente, utilizando o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se deslocavam dentro da coluna. Por este motivo a técnica ficou conhecida como cromatografia (*chrom* = cor e *graphie* = escrita), embora o processo seja independente da cor (Figueiredo, 2012).

A partir daí, a técnica foi sendo aperfeiçoada e em conjunto com os avanços tecnológicos, foi levado a um alto grau de sofisticação que resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas (Degani *et al.*, 1998). Atualmente é possível contar com uma variedade de métodos cromatográficos que podem ser classificados

considerando o tipo de superfície no qual ocorre a separação, sendo dividida em cromatografia de camada fina e cromatografia em coluna (Neto e Nunes, 2003) como apresentado na Figura 1.7.

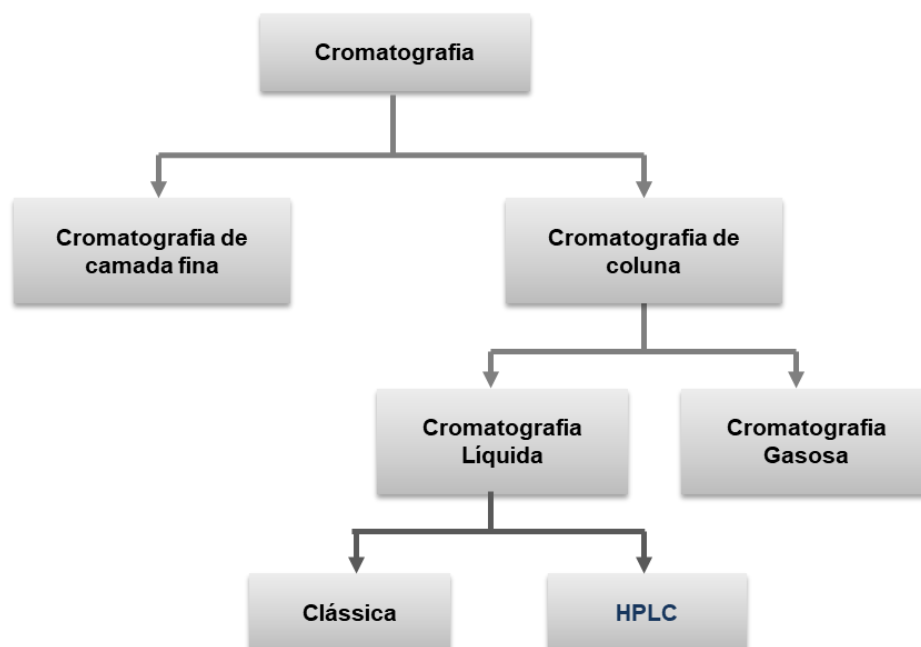


Figura 1.7 - Métodos cromatográficos (adaptado de Figueiredo, 2012).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), trata-se de um método analítico de separação para fins quantitativos e qualitativos. Esta técnica e posteriormente a *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) representam o culminar da modernização da Cromatografia Líquida (LC) sendo, atualmente, as técnicas de separação mais utilizadas em química analítica (Snyder *et al.*, 2010). O elevado crescimento destas técnicas ao longo dos anos está relacionado com a sua elevada eficiência, sensibilidade e reprodutibilidade, além da possibilidade de quantificar compostos não voláteis e termicamente instáveis, ou ainda amostras mais ou menos complexas como biomoléculas, antibióticos, pesticidas e substâncias inorgânicas. HPLC é também frequentemente usado para a análise de uma imensa variedade de compostos presentes em alimentos tais como vitaminas, ácidos orgânicos, hidratos de carbono, aditivos, proteínas, entre outros. Esta técnica tem vasta aplicação em diversos campos da ciência, pois requer apenas que a amostra seja solúvel na fase móvel, separável pela fase estacionária e identificável por um método de deteção (Tonhi e Collins, 2002).

A instrumentação necessária para a cromatografia líquida moderna é mais complexa e sofisticada do que a usada em cromatografia líquida clássica (Lanças, 2009), apresentando-se a configuração instrumental na Figura 1.8 (Lindle, 2013).

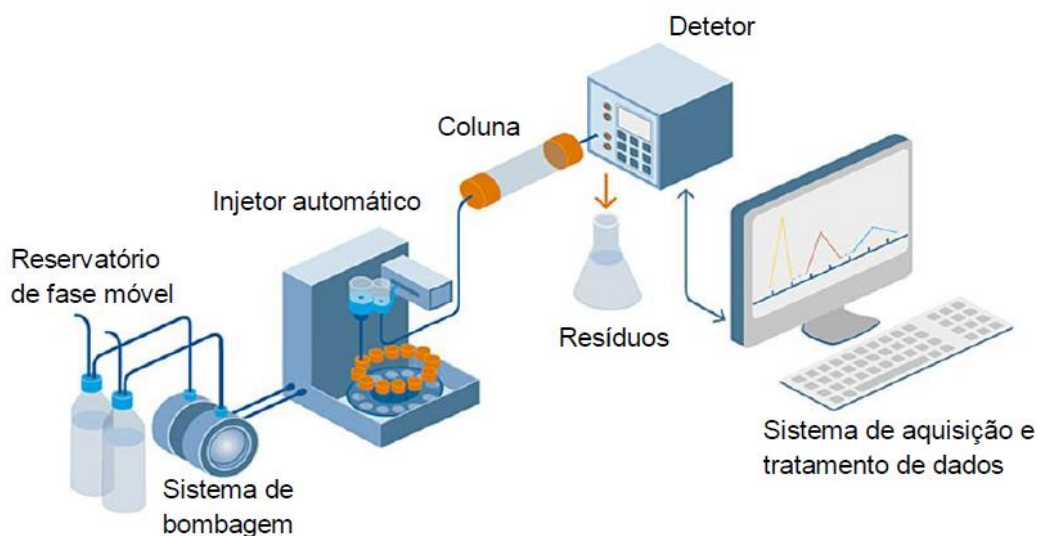


Figura 1.8 - Esquema com os principais componentes de um sistema de HPLC (Lindle, 2013).

No reservatório da fase móvel encontram-se os solventes que vão servir como fase móvel no sistema. É composto por um ou mais reservatórios que podem ser de vidro, plástico inerte ou aço inoxidável, sendo este último, não apropriado para fases móveis com baixo valor de pH pois podem ocasionar a corrosão do recipiente (Cecchi, 2003).

O sistema de bombagem força a passagem da fase móvel ao longo da coluna cromatográfica (fase estacionária) sob um fluxo específico e constante a elevadas pressões. As bombas devem permitir um fluxo estável e isento de pulsações, de modo a minimizar o ruído de fundo no detetor e conseqüentemente garantir uma boa resolução da análise. Devem ser facilmente programáveis para variar a proporção dos componentes da fase móvel ao longo da corrida cromatográfica, caso se pretenda uma eluição em gradiente (Chust, 1990).

O injetor automático introduz as amostras líquidas no fluxo da fase móvel sem perdas de pressão, que as transporta até à coluna cromatográfica e através dela (Chust, 1990).

A coluna de guarda ou pré-coluna, é instalada entre o injetor e a coluna cromatográfica e é utilizada para prevenir que impurezas e compostos fortemente retidos a contaminem, aumentando assim o seu tempo de vida útil (Araújo, 2004).

A coluna cromatográfica é o constituinte mais importante e crítico do sistema cromatográfico, pois é onde se dá a separação dos constituintes da amostra, que devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais possuem uma maior ou menor afinidade de retenção na fase estacionária e uma eluição a diferentes velocidades de migração e tempos de retenção, (Chust, 1990). Assim, a substância com maior afinidade com a fase estacionária é aquela que elui por último e a substância que elui em primeiro lugar será a de menor afinidade com a fase estacionária (Silva, 2016).

O forno da coluna garante que a temperatura se mantenha constante durante a separação do(s) composto(s) quando atravessam a coluna, permitindo uma maior reprodutibilidade da análise.

O detetor cromatográfico é um dispositivo conectado logo após a coluna cromatográfica que tem por objetivo, monitorizar o fluxo da fase móvel na saída da coluna. Quando em contacto com os analitos presentes no eluente, os detetores emitem sinais elétricos para o sistema de aquisição e tratamento de dados. Os detectores de HPLC devem possuir alta sensibilidade, seletividade, linearidade (correspondente ao aumento da concentração do analito), serem pouco sensíveis às variações de temperatura e fluxo, no caso de eluições em gradiente e, devem ainda ser precisos e ter boa reprodutibilidade (Figueiredo, 2012). Atualmente existe uma vasta gama de detetores para HPLC e a escolha dependerá fortemente das características químicas e físicas dos compostos a serem detetados, sendo os principais os detetores de: ultravioleta-visível (UV-Vis), fluorescência, índice de refração (IR), eletroquímico, condutimétrico e de espectrometria de massa (MS) (Chust, 1990).

O sistema de aquisição e tratamento de dados transforma o sinal elétrico emitido pelo detetor em picos, que correspondem ao(s) componente(s) da amostra cujo conjunto se denomina como cromatograma. Cada um destes picos é tratado pelo sistema, obtendo-se áreas (integração do pico), alturas do pico e tempos de retenção que, por sua vez, podem ser correlacionadas com resultados obtidos para compostos padrão, tornando-se possível identificar e quantificar o analito de

interesse (Chust, 1990). O *software* de aquisição e tratamento de dados como o *Millenium*³² ou o *Empower* permitem ainda programar uma série de parâmetros operatórios tais como fluxo da fase móvel, volume e número das injeções, entre outros (McMaster, 2007).

1.7.2. Modos de separação

Na cromatografia líquida de alta eficiência a separação dos diferentes analitos presentes na amostra ocorre através de vários mecanismos de interação com a fase móvel e a fase estacionária. A classificação dos modos de separação deve-se aos diferentes tipos de enchimento na coluna cromatográfica, que podem ser à base de sílica, quimicamente ligada ou materiais poliméricos (Tonhi e Collins, 2002). Importa salientar que qualquer que seja o material de preenchimento da coluna cromatográfica é este que irá determinar, juntamente com a fase móvel, a eficiência da separação pretendida. Por isso a etapa de seleção do tipo de coluna adequada para uma determinada separação constitui uma das decisões mais importantes para o desenvolvimento de um método analítico, pois as suas características afetam significativamente a seletividade e eficiência de separação dos analitos e, conseqüentemente, a qualidade da resolução dos cromatogramas (Chust, 1990).

A separação dos diferentes analitos pode dar-se por partição, adsorção, exclusão molecular ou por troca iônica, dependendo do tipo de coluna utilizada e dos analitos em análise (Chust, 1990).

A separação por partição é uma das mais utilizadas e depende da polaridade dos analitos da amostra e da sua afinidade para com as fases móvel e estacionária, cuja polaridade determina o tempo de retenção dos diferentes analitos na coluna (Siouffi e Nollet, 2000). Existem dois tipos de separação em cromatografia de partição: a separação em fase normal (NP-HPLC) e em fase reversa (RP-HPLC). Em fase normal, a fase estacionária utilizada é polar (normalmente de sílica) e a fase móvel é apolar sendo os solutos mais apolares eluídos primeiramente, enquanto que os polares são retidos pela fase estacionária e eluídos por último (Harris, 2005). Na fase reversa a fase estacionária é apolar (geralmente composta de sílica quimicamente ligada a cadeias de hidrocarbonetos, classificadas consoante o número de hidrocarbonetos adicionados como é o caso das colunas C8 e C18), e a

fase móvel polar, permitindo que os compostos mais polares sejam eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente (Harris, 2005).

As técnicas em fase reversa apresentam maior reprodutibilidade e maior aplicabilidade, sendo utilizadas em mais de 80 % de todos os métodos envolvendo a aplicação de HPLC (Siouffi e Nollet, 2000). Estas características devem-se aos diversos mecanismos de separação possíveis de executar (baseados em interações hidrofóbicas e hidrofílicas), juntamente com a disponibilidade de um grande número de fases estacionárias de elevada qualidade e diferentes níveis de hidrofobicidade. Atualmente as técnicas de RP-HPLC permitem, realizar a separação de uma grande variedade de substâncias, entre as quais os edulcorantes (Claessens, 2001; Engelhardt, 2011), ácidos orgânicos (Scherer *et al.*, 2012), compostos fenólicos (Saidani *et al.*, 2017), vitaminas (Barcia *et al.*, 2010) etc.

1.8. Validação de um método analítico de HPLC

Qualquer método analítico de ensaio envolve manipulações tornando-o suscetível a erros (sistemáticos e/ou aleatórios), que poderão alterar de forma significativa o valor do resultado final da análise (Relacre, 2000). Por isso, é fundamental a existência de um sistema de controlo e garantia de qualidade, de modo a que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados adequados com a qualidade pretendida (Martins, 2016).

Partindo deste princípio, membros da comunidade científica, da indústria e das agências reguladoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA), a *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (US-FDA) e a *Eurachem* da União Europeia (EU) (Eurachem, 2014) definiram parâmetros de validação, que posteriormente foram uniformizados pela *International Conference on Harmonization* (ICH) (ICH Guideline, 2005; Cassiano *et al.*, 2009). Esses parâmetros têm o objetivo de demonstrar, através da validação, que um determinado método analítico é adequado para os fins previstos, gerando resultados analíticos consistentes, confiáveis e exatos (Ribani *et al.*, 2004).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada 17, validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento,

material, atividade ou sistema realmente é consistente e conduz a resultados esperados (RDC, 2010).

Em Laboratórios Portugueses Acreditados, a validação completa dos métodos é exigida pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC) de acordo com normas de qualidade como a ISO/IEC 17025:2005, garantindo assim, que os métodos internos de ensaio que executam, satisfazem as especificações exigidas, de modo a que em qualquer futuro ensaio de análise de rotina, se obtenham resultados muito próximos ao verdadeiro valor do teor do analito presente na amostra (Relacre, 2000).

A validação de um método é um processo contínuo que implica a preparação de padrões, planeamento da estratégia analítica, aplicação do método até à verificação da validade dos resultados propriamente dita e caso haja alterações num método já implementado no laboratório, é necessário a sua revalidação (Ribani *et al.*, 2004).

É fundamental que o protocolo de validação esteja devidamente descrito num procedimento laboratorial, que os ensaios de validação sejam executados por técnicos competentes, realizados em equipamentos e instrumentos dentro das especificações e adequadamente calibrados de acordo com o Guia ICH, adaptado pela *European Medicines Agency* (ICH Guideline, 2005).

A validação, embora possa ser uma atividade exigente e morosa, é necessária pois um método não validado pode gerar resultados erróneos, com consequência direta ou indireta de desperdício de tempo, dinheiro e recursos, podendo colocar em causa a fiabilidade do produto (Huber, 2010).

1.8.1. Parâmetros de validação de métodos analíticos

As agências reguladoras disponibilizam guias para a validação de métodos analíticos que descrevem os parâmetros a avaliar (Huber, 2010). Na validação de métodos cromatográficos, o laboratório tem liberdade para definir o seu plano de validação, sendo suficiente efetuar uma validação parcial do método com parâmetros de validação adaptáveis a cada caso, ou seja, depende do objetivo do método (Relacre, 2000 e Martins, 2016). Em Portugal foi elaborado o Guia Relacre 13 que considera os seguintes parâmetros de validação: seletividade e especificidade, gama de trabalho e linearidade, sensibilidade, limite de quantificação, limite de deteção, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), eficiência de

extração (recuperação), estabilidade e robustez; (Cassiano *et al.*, 2009), com o objetivo de uniformizar os critérios utilizados e demonstrar que os métodos de ensaio usados possuem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida (Relacre, 2000).

Seletividade e especificidade

A seletividade e especificidade estão diretamente relacionados com a etapa da detecção, pois indicam a capacidade que um determinado método possui de quantificar exatamente o analito de interesse em presença de outros componentes da matriz da amostra (Ribani *et al.*, 2004). Estes parâmetros indicam o grau de interferências no ensaio cromatográfico e a sua influência nos resultados da análise. Uma vez que a matriz da amostra é, frequentemente, complexa, pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, tais como, solventes, impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz, e outros compostos com propriedades semelhantes às do analito (Martins, 2016).

De acordo com o Guia da Relacre 13, o termo seletividade representa a capacidade de um determinado método analítico, identificar e distinguir um analito numa mistura complexa sem a interferência dos outros constituintes da amostra, enquanto o termo especificidade consiste na habilidade do método em discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, o método garante que a grandeza medida provém apenas do analito de interesse (Cassiano *et al.*, 2009).

A seletividade é o primeiro parâmetro a ser avaliado na validação de um método cromatográfico e deve ser reavaliada continuamente durante todo o processo analítico e subsequente à etapa de validação, dado que algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente mas que podem co-eluir com o analito de interesse (Ribani *et al.*, 2004).

A seletividade de um método cromatográfico pode ser avaliada de várias maneiras, tais como, pela comparação de uma matriz contendo o analito de interesse com uma matriz isenta (ICH, 1995), sendo que, neste caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito de interesse cujo pico cromatográfico deve estar bem separado dos demais compostos presentes na amostra (Ribani *et al.*, 2004) ou

através da avaliação com detetores eficientes como o de arranjo de diodos, e o espectrómetro de massa, que comparam o pico do espectro obtido na separação com o de um padrão, facilitando a identificação (Ribani *et al.*, 2004). Podem ainda, realizar-se testes de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Neste caso, convém que as amostras sejam analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade sendo o método considerado específico e seletivo quando se confirmarem percentagens de taxas de recuperação dentro dos critérios de aceitação pré-definidos, ou seja, próximas de 100 % (Relacre, 2000).

Gama de trabalho

Para métodos que envolvam o traçado de curvas de calibração existe uma faixa de concentrações na qual o método pode ser aplicado com determinado nível de precisão e exatidão designada por gama de trabalho. Os primeiros valores desta gama correspondem aos limites de deteção e de quantificação e os últimos dependem da resposta do equipamento de medição (Relacre, 2000). Os pontos definidos no intervalo de concentrações escolhido devem estar distribuídos equitativamente sobre a faixa linear dinâmica (Sargaço *et al.*, 2017).

A adequabilidade da gama de trabalho é avaliada segundo o teste de homogeneidade das variâncias e/ou pelo teste t *de Student* de acordo com a ISO 8466-1 (1990). O teste de homogeneidade de variâncias, é um teste estatístico, normalmente designado por teste F, que consiste na análise de dez réplicas independentes do primeiro (S^2_1) e último padrão (S^2_{10}), que são os pontos extremos da curva de calibração, como indicado nas equações 1.1 e 1.2, com o objetivo de verificar se existe diferença significativa entre as variâncias, nos limites da gama de trabalho (Costa, 2014).

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} |y_{i,j} - \bar{y}_i|^2}{n_i - 1} \quad (1.1)$$

Em que,

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (1.2)$$

Para $i = 1$ e $i = 10$. Onde: i - o número do padrão; j - o número de repetições efetuadas para cada padrão; S_i^2 - variância; y_i - o valor do sinal no padrão i ; \bar{y}_i - a média dos valores de y_i ; n_i - o número de réplicas.

Em seguida as diferenças entre as variâncias são testadas efetuando o cálculo do valor teste PG, através das equações 1.3 e 1.4.

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}, \text{ se } S_{10}^2 > S_1^2 \quad (1.3)$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}, \text{ se } S_1^2 > S_{10}^2 \quad (1.4)$$

O resultado obtido é então comparado com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fisher*, para $(N - 1)$ graus de liberdade e a decisão estatística é a seguinte:

- Se $PG > F$, 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 $PG \leq F$.
- Se $PG \leq F$, a diferença entre as variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada (Relacre, 2000).

Linearidade e curva de calibração

Denomina-se linearidade à capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de uma determinada faixa de aplicação (Ribani *et al.*, 2004).

Para garantir que isto ocorra realiza-se a calibração analítica do equipamento através da preparação de uma série de soluções padrão de concentração pré definida; estas serão medidas no equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar (Relacre, 2000). Em seguida, de acordo com a norma ISO 8466-1 (1990) para modelos lineares, estabelece-se uma curva de calibração através da correlação entre o sinal medido pelo detetor (área ou altura dos picos) e a

concentração do analito. No caso de a curva de calibração ser linear é descrita pela equação 1.5.

$$y = m \cdot C + b \quad (1.5)$$

Onde: y - resposta medida (altura ou área do pico do cromatograma); b - ordenada na origem; C - concentração do analito; m - declive da curva de calibração.

A linearidade da curva de calibração pode então ser avaliada através do coeficiente de determinação (R^2) ou do *teste de Mendel*.

O coeficiente de determinação (R^2) traduz a adequabilidade de um modelo linear aos valores experimentais, bem como o coeficiente de correlação de *Pearson* (R), que quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de dados e menor a incerteza dos coeficientes de regressão (m e b) estimados. O Guia da Relacre 13, adaptado pelos critérios internos do INIAV, aconselha um coeficiente de correlação superior a 0,995, no entanto, a ANVISA recomenda um valor igual ou superior a 0,99 e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) um valor acima de 0,90, como indicativo de um bom ajuste linear (Ribani *et al.*, 2004 e INMETRO, 2016). De ressaltar que este teste de linearidade deve ser bem interpretado, pois os coeficientes de correlação são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade (Relacre, 2000).

O *teste de Mandel* implica o cálculo das funções linear e polinomial bem como os respetivos desvios-padrão residuais ($S_{y/x}$ e S_{y_2}) (Relacre, 2000) pelas equações 1.6 e 1.7. A diferença de variâncias (DS^2) é calculada pela equação 1.8.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}} \quad (1.6)$$

$$S_{y_2} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 3}} \quad (1.7)$$

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y_2}^2 \quad (1.8)$$

Sendo: $S_{y/x}$ - o desvio padrão residual da curva de calibração linear; S_{y_2} - o desvio padrão residual da curva de calibração polinomial; N - o número de padrões de calibração; y_i - o valor do sinal no padrão; \hat{y}_i - o valor estimado pela reta de

calibração linear ou polinomial; $S_{y/x}^2$ - a variância da função linear; $S_{y^2}^2$ - a variância da função polinomial. Posteriormente, calcula-se o valor teste, PG, através da equação 1.9:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (1.9)$$

O valor de PG obtido é comparado com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fisher*.

- Se $PG \leq F$: a função de calibração é linear.
- Se $PG > F$: a função de calibração é não linear.

No caso de $PG > F$, deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho ou de se aplicar uma função de calibração não linear (Relacre, 2000).

Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do equipamento ou do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas do analito (Amarante *et al.*, 2001). Em métodos analíticos de calibração linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e corresponde ao declive (m) da reta sendo determinada simultaneamente com testes de linearidade através da razão entre a variação do sinal medido (Δy) e a variação da concentração de analito (ΔC), como representado pela equação 1.10.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta y}{\Delta C} \quad (1.10)$$

Este parâmetro depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada; um método é considerado de elevada sensibilidade quando uma pequena alteração na concentração do analito é capaz de resultar numa alteração significativa no sinal obtido (Relacre, 2000).

Limiares analíticos

Em amostras com baixos teores de analito é importante determinar qual o menor valor de concentração de analito que pode ser detetado e quantificado pelo método

utilizado (INMETRO, 2016). O cálculo dos limites analíticos envolve a determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), ou seja, os limites inferiores da curva de calibração, que correspondem a baixos níveis de concentração (Leite, 1996 e IPAC, 2011).

Estes limites dependem de diversos fatores que variam no tempo, tais como, contaminações, tipo de amostra, equipamento, operador, etc., devendo assim ser reavaliados sempre que haja variação de equipamento, técnicos, critérios ou quando se trabalha com gamas baixas de concentração (IPAC, 2011).

Os limites de detecção e quantificação da curva de calibração devem ser confirmados através da realização de ensaios de recuperação (Sargaço *et al.*, 2017).

O **limite de detecção (LD)** corresponde a concentração mínima de analito que pode ser detetada numa amostra, com uma certeza estatística razoável, mais não necessariamente quantificada como um valor exato (Relacre, 2000).

Este parâmetro é expresso em unidades de concentração e calculado de acordo com a equação 1.11.

$$LD = \frac{3,3 S_{y/x}}{m} \quad (1.11)$$

Onde: $S_{y/x}$ - é o desvio padrão residual da curva de calibração e m - o declive da curva de calibração.

O **limite de quantificação (LQ)** corresponde à menor concentração a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração. Tal como o (LD) é também expresso em unidades de concentração e pode ser calculado através da equação 1.12.

$$LQ = \frac{10 S_{y/x}}{m} \quad (1.12)$$

Este limiar, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória.

Embora a equação referida seja a principal forma de calcular este parâmetro, em métodos em que utilizam curvas de calibração, também é possível considerar o

primeiro ponto da curva de calibração linear como LQ (Relacre, 2000). Neste caso, o valor de LD é um terço de LQ.

Precisão

O cálculo da precisão tem como objetivo avaliar a dispersão de resultados obtidos numa série de medidas efetuadas numa mesma amostra e também identificar possíveis erros sistemáticos ou aleatórios, garantindo a qualidade dos resultados (Ribani *et al.*, 2004). É normalmente expressa em termos de variância, desvio padrão e coeficiente de variação sob condições de repetibilidade, reprodutibilidade e de precisão intermédia também conhecida como variabilidade intralaboratorial. (Relacre, 2000).

Através da avaliação da precisão é possível verificar se o método tem capacidade de repetir e reproduzir os resultados obtidos em análises da mesma amostra ou padrão.

A **repetibilidade** exprime a concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra obtida em condições idênticas de medição (mesmo analista, mesmo laboratório, mesmo equipamento e mesmos reagentes) e analisadas pelo mesmo método de ensaio, durante um curto intervalo de tempo, ou seja, em condições de repetibilidade (Relacre, 2000). Para se determinar este parâmetro deve-se analisar um conjunto de amostras ou padrões contendo o analito de interesse em três níveis de concentração (Ministério da Agricultura, 2011). Para cada nível, a análise deve ser realizada em, pelo menos, seis réplicas independentes, calculando-se a concentração para cada réplica. Esta avaliação é feita pelo cálculo do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), que é numericamente igual à razão entre o desvio-padrão da repetibilidade (S_{ri}) e a média dos resultados obtidos, (\bar{x}), de acordo com as expressões 1.13 e 1.14.

$$S_{ri} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (1.13)$$

$$CV_r (\%) = 100 \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \quad (1.14)$$

Em que: S_{ri} - é o desvio padrão absoluto dos valores de concentração de n tomas analisadas em condições de repetibilidade; n - o número de amostras; y_k - o valor individual obtido; \bar{y} - a média aritmética dos valores individuais obtidos e \bar{x} - a média dos valores de concentração considerados.

A **precisão intermédia** também conhecida por variabilidade intralaboratorial, indica o efeito das condições que podem sofrer alterações no laboratório (operadores diferentes, equipamentos diferentes e intervalo temporal diferente) no método de análise da mesma amostra ou padrão (ISO 5725-3; Relacre, 2000).

O objetivo da validação da precisão intermédia é assegurar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados (Relacre, 2000).

A precisão intermédia poderá ser expressa por vários métodos, sendo um destes, através do cálculo do desvio padrão absoluto (S_{Ri}) ou ainda pelo desvio padrão relativo (CV_R) como descrito nas expressões 1.15. e 1.16.

$$S_{Ri} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (1.15)$$

Sendo: S_{Ri} - o desvio padrão absoluto de precisão intermédia; n - número de amostras; y_k - valor individual obtido e \bar{y} - a média aritmética dos valores individuais obtidos.

$$CV_R = 100 \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \quad (1.16)$$

Onde: CV_R - é o coeficiente de variação relativo de precisão intermédia e \bar{x} - a média das concentrações do número de ensaios realizados.

Taxa de recuperação

A taxa de recuperação é um parâmetro que avalia a eficiência do procedimento de extração, já que na maioria dos métodos analíticos, as etapas de extração podem levar a perdas do analito de interesse e provocar alteração do resultado final da análise, obtendo-se apenas resultados inferiores à concentração real do analito na amostra.

Assim, a taxa de recuperação representa a relação entre o resultado teórico e o resultado experimental de uma análise a uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito. Sendo assim, torna-se necessária a avaliação da quantidade de padrão de analito que deverá ser adicionada à amostra, extraída e quantificada (INMETRO, 2016).

Deste modo, a uma amostra são adicionadas diferentes concentrações de padrão, de acordo com a concentração esperada de analito, por exemplo, próxima da concentração máxima de utilização, próxima do LD, próxima da concentração intermédia da gama de trabalho do método ou entre 50 a 150 % da concentração esperada do analito, em amostras com maiores concentrações (Relacre, 2000)

A taxa de recuperação é calculada através da seguinte equação 1.17:

$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = 100 \frac{(C_{\text{fortificada}} - C_{\text{matriz}})}{C_{\text{adicionada}}} \quad (1.17)$$

Onde: $C_{\text{fortificada}}$ - é a concentração da amostra fortificada; C_{matriz} - a concentração da amostra e $C_{\text{adicionada}}$ - a concentração de analito adicionada nas amostras.

Os valores de taxa de recuperação obtidos através da equação 1.17, irão indicar o desempenho da extração. Assim, se:

< 100%: corresponde a baixas taxas de recuperação que podem indicar que o modo de preparação da amostra deverá ser otimizado, ou seja, deverão ser feitas alterações ao procedimento de extração como por exemplo tipo de solvente, tempo de agitação, entre outras;

> 100%: representa elevadas taxas de recuperação que podem resultar de outros componentes da matriz produzirem resposta analítica quantificável a um mesmo comprimento de onda ocasionando interferência na análise (Silva, 2016).

No INIAV consideram-se valores aceitáveis de taxa de recuperação os que se encontrem na gama de 80 a 120% (INIAV, 2018). Brito *et al.* (2003), apresenta, também, uma tabela de valores aceitáveis da taxa de recuperação em função da concentração do analito que pode ser útil a avaliação deste parâmetro.

Capítulo 2

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia desenvolvida para a determinação de açúcares e ácidos orgânicos em matrizes hortofrutícolas teve como base as orientações dos métodos de referência da AOAC anteriormente mencionados na seção 1.6. do capítulo 1. Os procedimentos foram adaptados às matrizes a estudar de acordo com as pesquisas bibliográficas realizadas, manuais das colunas, bem como, os equipamentos disponíveis no laboratório.

Realizaram-se testes de determinação conjunta de açúcares e ácidos orgânicos utilizando uma única coluna no sistema cromatográfico com dois detetores em série, o IR que deteta os açúcares e alguns ácidos orgânicos e o PDA que deteta os ácidos orgânicos. Nestes ensaios preliminares foram testadas várias colunas cromatográficas C18 apresentadas na Tabela 2.1, com base em trabalhos anteriormente desenvolvidos, na análise de sumos de frutos nos laboratórios do INIAV.

Para a determinação dos açúcares foram adaptadas a ISO 22662:2007 (análise de leites e derivados) e o método AOAC 980.13 (1990), por HPLC-RI. Para a determinação dos ácidos orgânicos adaptou-se o método AOAC 986.13 (1986) e as técnicas descritas por Costa (2012), Reuter (2015) e por Scherer *et al.* (2012) usando o HPLC-PDA em fase reversa com detecção a 254 nm para o ácido ascórbico e a 210 nm para os outros ácidos.

Para a determinação de açúcares foram testadas três colunas de HPLC existentes na UTI do INIAV (*Rezex RCM* da *Phenomenex*, *Carbohidrates* e *SugarPak* da *Waters*). Foi selecionada para o trabalho a coluna *SugarPak* da *Waters* semelhante à *Rezex RCM*, e utilizada em condições cromatográficas baseadas nas especificações do fabricante e em outros autores (Choi *et al.*, 2015 e Snow *et al.*, 2015), tendo-se selecionado como fase móvel EDTA cálcio 0,01mM em água.

Para a determinação de ácidos orgânicos, selecionou-se a coluna de HPLC *Aquasil* C18 da *Thermo Scientific* em uso no laboratório. Coluna que foi selecionada com base nos estudos desenvolvidos em queijo por Costa (2012), que adaptou o método descrito por Akalin *et al.* (2002). A escolha inicial das condições cromatográficas foi baseada nas especificações do fabricante da coluna e em condições referidas por Reuter (2015), tendo-se selecionado como fase móvel uma mistura de tampão fosfato 0,025 M a pH 2,4 com acetonitrilo (99:1 V/V) por ter proporcionado uma melhor separação dos vários ácidos.

As amostras hortofrutícolas foram provenientes de indústrias parceiras do projeto ProEnergy, produtores e mercado locais, tendo sido tratadas de modo a manterem a sua heterogeneidade. Realizou-se a extração de açúcares (adaptada de ISO 22662:2007) e de ácidos orgânicos (adaptada de Costa 2012) das amostras para posterior quantificação de analitos de interesse através de HPLC pelo método de padrão externo e com base no traçado de curvas de calibração.

2.1. Equipamentos

Os equipamentos utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho foram os seguintes:

- HPLC Linha 1 (aplicado para determinação de açúcares) - Sistema cromatográfico de elevada resolução, marca *Waters*, com injetor automático modelo 717plus Autosampler, equipado com 2 bombas, modelo 510, coluna e respetivo forno de coluna, modelo (Col. HTR.) e 2 detetores, sendo um de arranjo de díodos UV-Vis, modelo 2996, e outro de Índice de Refração, modelo 2414;
- HPLC Linha 2 (usado para determinação de ácidos orgânicos) - Sistema cromatográfico de elevada resolução, marca *Waters*, modelo alliance 2690, equipado com injetor automático e bomba quaternária; coluna e forno de coluna, modelo Jetstream 2 plus e 2 detetores, sendo um de arranjo de díodos UV-Vis, modelo 996 e outro de fluorescência, modelo 474;
- Sistema de aquisição e controlo dos sistemas cromatográficos, *Software* marca *Waters*, modelo Millennium ³², versão 4.00; computador HP Compaq;
- Potenciómetro, marca *Cole-Parmer*, modelo 05669-20;
- Placa de aquecimento e agitação magnética com controlo de temperatura e velocidade, marca *Selecta*, modelo Agimatic, Ref.243;
- Vortex, marca *Heidolph*, modelo Reax top, com controlo de velocidade;
- Sistema de filtração a vácuo com bomba, marca GAST, modelo DOA-P104-BN.
- Banho de ultra-sons, marca *Branson*, modelo Branson 5200;
- Banho de ultra-sons, marca *Branson*, modelo Branson 2200,
- Ultra-turrax, marca *IKA-Labortechnik*, modelo T25;

- Sistema de purificação de água tipo II (água destilada), marca *Millipore*, modelo *Elix*;
- Sistema de ultrapurificação de água tipo I (água Milli-Q) com resistividade 18,2 MΩ a 25 °C, marca *Millipore*, modelo Milli-Q 7000;
- Balança analítica de precisão, marca *Mettler Toledo*, modelo AG245;
- Balança analítica, marca *Mettler*, modelo 4000;
- Centrífuga marca *Sigma*, modelo 2K15 e rotor 12139;
- Frigorífico combinado 4 °C e -20 °C, marca *Whirlpool*;
- Arca congeladora horizontal a -20 °C marca *Fricon*;
- Micropipetas marca *Gilson* (de 10 mL a 20 µL);
- Estufa marca *Memmert*, modelo 854 Schwabach;

O tipo de pré-colunas e colunas utilizadas nos ensaios de cromatografia, bem como as suas principais características, podem ser observados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Colunas cromatográficas utilizadas durante o desenvolvimento do trabalho e respetivas especificações do fabricante.

Coluna	Pré-coluna	Marca	Tamanho (mm)	D _{poro} (µm)	P _{máx} (psi)
<i>Spherisorb ODS 2</i>	Nova-Pak C18	<i>Waters</i>	4,6 x 150	5	4000
<i>Nova Pak</i>	Nova-Pak C18	<i>Waters</i>	3,9 x 150	4	4000
<i>Aquasil C18</i>	KJ0-4282	<i>Thermo Scientific</i>	4,6 x 250	5	4000
<i>Synergi Hydro</i>	KJ0-4282	<i>Phenomenex</i>	4,6 x 250	4	2200
<i>Rezex RCM</i>	Sugar-Pak	<i>Phenomenex</i>	300		2000
<i>Carbohydrates</i>	Carbohydrates	<i>Waters</i>	4,6 x 250	4	6000
<i>Sugar-Pak</i>	Sugar-Pak	<i>Waters</i>	6,5 x 300		2000

D - diâmetro; P - pressão; máx - máxima

2.2. Materiais

Para desenvolver este trabalho foi necessário utilizar os seguintes materiais:

- Balões volumétricos certificados de 10 a 2000 mL;

- Erlenmeyers de 100 a 250 mL;
- Copos de 20 a 1000 mL;
- Provetas de 100 a 2000 mL;
- Frascos Schott de 1000 a 5000 mL;
- Filtros de membrana, marca Filter-Lab e diâmetro 47 mm, com membrana de nylon 0,22 µm de diâmetro de poro;
- Filtros de seringa com diâmetro de 25 mm, marca Whatman, com membrana de nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro;
- Filtro de papel rápido marca Whatman N° 1, 150 mm diâmetro;
- Vials de HPLC de 1 ml e 2 mL e inserts redutores de capacidade 200 µL;
- Funis;
- Kit de filtração a vácuo em vidro;
- Pipetas volumétricas certificadas de 1, 2, 5, 10 e 25 mL;
- Pipetas de Pasteur de plástico de 3 mL;
- Seringas de 3 mL;
- Tubos de centrifuga graduados de 15, 30 e 50 mL.
- Magnetes
- Espátulas

2.3. Reagentes

Os reagentes utilizados na preparação de soluções, suas fórmulas químicas e respectivas especificações do fabricante, encontram-se apresentados na Tabela 2.2. Todos os reagentes foram de grau pró-análise ou de pureza adequada para HPLC.

A água utilizada na preparação das amostras, soluções-padrão e fase móvel apresentou pureza de grau I (resistividade 18,5 MΩ cm, a 25 °C), tendo sido obtida a partir do sistema Milli-Q de purificação de água.

Tabela 2.2 - Reagentes utilizados e especificações do fabricante.

Reagente	Fórmula	Marca	Nº CAS
Acetato de zinco (p.a.)	ZnC ₄ .H ₆ O ₄ .2H ₂ O.	<i>Merck</i>	5970-45-6
Acetonitrilo (para HPLC)	CH ₃ CN	<i>Carlo Erba</i>	75-05-8
Ácido orto-fosfórico (85%)	H ₃ PO ₄	<i>Merck</i>	7664-38-2
Di-hidrógeno fosfato de potássio (≥ 99%)	KH ₂ PO ₄	<i>Panreac</i>	7778-77-0
EDTA cálcio (99%)	C ₁₀ H ₁₂ CaN ₂ Na ₂ O ₈	<i>Sigma</i>	62-33-9
Hexacianoferrato de potássio (≥ 99%)	K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O	<i>Merck</i>	14459-95-1

Os padrões de açúcares e de ácidos orgânicos foram selecionados com base nos resultados encontrados na pesquisa bibliográfica e nos perfis obtidos para os hortofrutícolas. Foram utilizados os padrões de açúcares que se encontram apresentados na Tabela 2.3. onde se apresentam também as respectivas fórmulas químicas e especificações.

Tabela 2.3 - Padrões de açúcares e especificações do fabricante.

Padrão	Fórmula	Marca	Nº CAS
D (-) Arabinose (≥ 98%)	C ₅ H ₁₀ O ₅	<i>Merck</i>	10323-20-3
D (+) Glucose (99,5%)	C ₆ H ₁₂ O ₆	<i>Sigma-Aldrich</i>	50-99-7
Estaquiose (≥ 98%)	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	<i>Sigma-Aldrich</i>	54261-98-2
D (-) Frutose (99%)	C ₆ H ₁₂ O ₆	<i>Sigma-Aldrich</i>	57-48-7
D (+) Galactose (99%)	C ₆ H ₁₂ O ₆	<i>Sigma-Aldrich</i>	59-23-4
D Maltose (≥ 95%)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ .H ₂ O	<i>Merck</i>	69-79-4
D (+) Manose (≥ 99%)	C ₆ H ₁₂ O ₆	<i>Merck</i>	3458-28-4
Rafinose (≥ 98%)	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	<i>Difco</i>	512-69-6
L (+) Rhamnose (≥ 99%)	C ₆ H ₁₂ O ₅	BDH	10030-85-0
Sacarose (≥ 99,5%)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	<i>Sigma-Aldrich</i>	57-50-1
D-Sorbitol (98%)	C ₆ H ₁₄ O ₆	<i>Sigma-Aldrich</i>	50-70-4
D (+) Xilose (99%)	C ₅ H ₁₀ O ₅	<i>Sigma-Aldrich</i>	58-86-6
Manitol (98%)	C ₆ H ₁₄ O ₆	<i>Sigma-Aldrich</i>	69-65-8
Mio-inositol (≥ 99%)	C ₆ H ₁₂ O ₆	<i>Sigma-Aldrich</i>	87-89-8
Lactose (≥ 98,0%)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	<i>Sigma-Aldrich</i>	63-42-3

Os padrões de ácidos orgânicos que foram utilizados estão indicados na Tabela 2.4, onde se apresentam também as respectivas fórmulas químicas, valores de pK_a e especificações.

Tabela 2.4 - Padrões de ácidos orgânicos e especificações do fabricante.

Padrão	Fórmula	Marca	Nº CAS	pK_a
Ácido acético (99,8%)	$C_2H_4O_2$	<i>Riedel-de Haën</i>	64-19-7	4,75
Ácido ascórbico (> 99,5%)	$C_6H_8O_6$	<i>Sigma-Aldrich</i>	50-81-7	4,17 e 11,6
Ácido cítrico (\geq 99,5%)	$C_6H_8O_7$	<i>Sigma-Aldrich</i>	77-92-9	3,15, 4,77 e 6,40
Ácido láctico (90-92%)	$C_3H_6O_3$	<i>Riedel-de Haën</i>	50-21-5	3,85
Ácido málico (99%)	$C_4H_6O_5$	<i>BDH</i>	6915-15-7	3,4 e 5,13
Ácido oxálico (99%)	$C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$	<i>Alfa Aesar</i>	144-62-7	1,25 e 4,28
Ácido propiónico (\geq 99,0%)	$C_3H_6O_2$	<i>Merck</i>	79-09-4	4,87
Ácido tartárico (99,5%)	$C_4H_6O_6$	<i>Merck</i>	87-69-4	4,37

2.4. Amostras

Procedeu-se à recolha de trinta amostras de hortofrutícolas/subprodutos que incluíram frutos, hortícolas, raízes, bolbos e tubérculos, sem valor comercial para o mercado em fresco. Deste modo, a operação de amostragem foi realizada em hortofrutícolas que não poderiam ser vendidos em fresco, fazendo parte dos subprodutos/resíduos de baixo valor económico devido a estarem danificados, com mau aspeto, com cortes, fora de calibre, etc, os quais, geralmente, têm como destino a alimentação animal, a inceneração ou a compostagem. Estes produtos foram fornecidos por parceiros do projeto ProEnergy, por produtores locais ou oferecidos pelo mercado local, no período de maio a julho de 2019, conforme a Tabela 2.5. A selecção dos hortofrutícolas dependeu da sua disponibilidade na época do ano e da possibilidade de fornecimento pelas entidades fornecedoras durante o período de recolha.

Dada a diversidade das amostras, foi feito o agrupamento dos hortofrutícolas de acordo com as suas principais características a tendo por base a estrutura botânica apresentada na Tabela 1.1, segundo a qual os frutos analisados são divididos em dois grupos: frutos hortícolas (beringela, chuchu, curgete e tomate) e frutos não hortícolas. Os frutos não hortícolas, foram ainda subdivididos em quatro subgrupos:

frutos pomóides (maçã e pera), frutos prunóides (alperce, ameixas, cereja, nêspira e pêsego), frutos cítricos (laranja e limão) e frutos tropicais (abacaxi, banana e melancia). Restam os grupos das raízes, bolbos e tubérculos (alho, batatas; beterraba, cebola e cenoura) e das folhas que foram subdivididas em hortaliças folhosas (alface, brócolos, couve e espinafre) e ervas aromáticas (coentros, manjeriço e salsa).

Tabela 2.5 - Amostras de hortofrutícolas, fornecedor e data de fornecimento em 2019.

Grupos	Hortofrutícolas	Fornecedor	Data
Frutos hortícolas	Beringela	Mercado	26 Junho
	Chuchu	Mercado	26 Junho
	Curgete	Mercado	26 Junho
	Tomate	Mercado	26 Junho
Frutos pomóides	Maçã alcobaça	Campotec	19 Março
	Pera rocha	Campotec	19 Março
Frutos prunóides	Alperce	Mercado	26 Junho
	Ameixa amarela	Produtor	26 Junho
	Ameixa vermelha	Produtor	26 Junho
	Cereja	Produtor	9 Maio
	Nêspira	Produtor	9 Maio
	Pêsego	Mercado	26 Junho
Frutos cítricos	Laranja	Campotec	9 Maio
	Limão	Produtor	3 Julho
Frutos tropicais	Abacaxi	Campotec	19 Março
	Banana	Mercado	3 Julho
	Melancia	Campotec	26 Junho
Raízes, bolbos e tubérculos	Alho	Mercado	26 Junho
	Batata	Mercado	26 Junho
	Batata doce	Produtor	3 Julho
	Beterraba	Mercado	3 julho
	Cebola	Mercado	26 Junho
	Cenoura	Campotec	19 Março

Grupos	Hortofrutícolas	Fornecedor	Data
Hortaliças folhosas	Alface	Mercado	3 Julho
	Brócolos	Mercado	3 Julho
	Couve portuguesa	Mercado	3 Julho
	Espinafre	Campotec	19 Março
Ervas aromáticas	Coentros	Mercado	3 Julho
	Manjeriço	Mercado	3 Julho
	Salsa	Campotec	19 Março

Foram ainda tratadas, extraídas e analisadas amostras de maçã liofilizada e amostras de resíduos de outra indústria parceira do *ProEnergy*, no entanto, devido a regras de confidencialidade do projeto não se apresentam os resultados desses trabalhos.

2.5. Procedimento experimental

2.5.1. Preparação de soluções

As soluções foram preparadas de acordo com adaptação das metodologias referenciadas em normas internacionais, procedimentos indicados nos manuais das colunas, bem como adaptados da bibliografia consultada. De seguida descreve-se o procedimento de preparação destas soluções.

Solução de Carrez I: Esta solução foi preparada através da adição de $15 \pm 0,05$ g de hexacianoferrato de potássio tri-hidratado para um balão volumétrico de 100 mL e depois fez-se o volume do balão com água destilada, o que resultou numa solução com uma concentração de 15 % (p/V).

Solução de Carrez II: Procedeu-se à pesagem de $30 \pm 0,05$ g de acetato de zinco para um balão volumétrico de 100 mL, sendo o volume completado com água destilada, resultando em uma solução com concentração de 30 % (p/V).

Solução tampão fosfato (0,025 M): Pesou-se numa balança analítica 3,4 g (pesado com aproximação de 0,0005 g) de di-hidrogeno fosfato de potássio para um copo volumétrico e adicionou-se água Milli-Q até aos 800 ml. Em seguida, utilizando o

potenciômetro, acertou-se o pH a 2,4 numa placa de agitação magnética com uma solução de ácido fosfórico a 85 % e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água ultrapura. Por fim, procedeu-se à filtração a vácuo da solução com filtro de membrana de *nylon* seguida de desgaseificação com ultra-sons durante 30 minutos.

Solução tampão fosfato (0,05 M): Numa balança analítica pesou-se $6,8 \pm 0,0005$ g de di-hidrogeno fosfato de potássio para um copo volumétrico e dissolveu-se com água Milli-Q até aos 800 mL, em seguida, utilizando o potenciômetro, acertou-se o pH a 2,8 numa placa de agitação magnética, com uma solução de ácido fosfórico a 85 %, transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água ultrapura. Em seguida filtrou-se a vácuo a solução com filtro de membrana de *nylon* e procedeu-se à desgaseificação com um equipamento de ultra-sons durante 30 minutos.

Solução EDTA cálcio (0,01 mM): Pesou-se na balança analítica $0,05 \pm 0,0005$ g de EDTA cálcio, dissolveu-se com água ultrapura e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL completando o volume com água Milli-Q. Por fim, procedeu-se à filtração a vácuo da solução com filtro de membrana de *nylon* e desgaseificou-se por 30 minutos num banho de ultra-sons.

Solução de regeneração da coluna SugarPak: Na balança analítica de precisão, pesou-se $0,5 \pm 0,0005$ g de EDTA cálcio e dissolveu-se com água ultrapura, em seguida transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 1000 mL completando o volume com água ultrapura. Por fim, procedeu-se à filtração a vácuo com um filtro de membrana de *nylon* e desgaseificou-se por 30 minutos num banho de ultra-sons. Esta solução de EDTA (0,001 M) foi utilizada para condicionamento e regeneração da coluna *SugarPak* quando invertida, operação a efetuar sempre que necessário devido ao aumento de pressão do sistema e ao fim do consumo de 5 L de fase móvel.

Fase móvel (açúcares): Solução aquosa de EDTA cálcio (0,01 mM) filtrada e desgaseificada.

Fase móvel (ácidos orgânicos): Solução de tampão fosfato (0,025 M a pH 2,4) e acetonitrilo na proporção 99:1 (V/V) filtrada e desgaseificada.

Soluções-mãe e padrões de açúcares: Para a preparação das soluções-mãe (s-m) padrão pesou-se cerca de $10 \pm 0,0005$ g de cada um dos padrões de açúcar numa balança analítica cujas soluções foram preparadas em balões volumétricos com volume (V) de 50 mL e usando água Milli-Q. As soluções assim preparadas apresentaram concentração final de 200 mg/mL.

A partir das soluções-mãe, foram preparados sete padrões mistos de açúcares a diferentes concentrações para a mistura de compostos: sacarose, glucose, frutose, manitol e sorbitol, tal como descrito na Tabela 2.6.

Os cálculos para a preparação das soluções padrão misto de trabalho recorreram à equação 2.1.

$$C_{s-m} \cdot V_{s-m} = C_{final} \cdot V_{bal\tilde{a}o} \quad (2.1)$$

Onde: C_{s-m} - é a concentração da solução mãe; V_{s-m} - o volume da solução mãe; C_{final} - a concentração do padrão de trabalho e $V_{bal\tilde{a}o}$ - o volume do balão de diluição onde se prepara a solução padrão misto de trabalho.

Tabela 2.6 - Preparação de soluções padrão misto de sacarose, glucose, frutose, manitol e sorbitol a partir da solução mãe de cada padrão (C_{s-m} de 200 mg/mL).

Padrão Misto	$V_{bal\tilde{a}o}$ (mL)	V_{s-m} (mL)	C_{final} (mg/mL)
P1	100	0,5	1
P2	100	2,5	5
P3	100	5	10
P4	100	7,5	15
P5	100	10	20
P6	100	12,5	25
P7	50	7,5	30

Soluções-mãe e padrões de ácidos orgânicos: A gama de trabalho (zona de concentrações de padrões a utilizar na reta de calibração) foi escolhida especificamente para cada um dos ácidos, dado que a intensidade de sinal é diferente para cada um dos analitos (nomeadamente ácido oxálico e ascórbico). Deste modo, foi escolhida uma gama de concentrações que permitisse uma intensidade de sinal equivalente para todos os analitos a fim de se obter um

cromatograma adequado.

Para a preparação das soluções mãe foram utilizados oito ácidos orgânicos: acético, ascórbico, cítrico, láctico, málico, oxálico, propiónico e tartárico, com concentração mássica de 40 g/L (2 g/L para o oxálico e 25 g/L para o ascórbico) pesaram-se cerca de $0,8 \pm 0,005$ g de cada ácido ($0,1 \pm 0,005$ g para o oxálico e $0,5 \pm 0,005$ g para o ascórbico) numa balança analítica, para balões volumétricos de 20 mL (50 mL para o ácido oxálico) e o volume foi completado com água *Milli-Q*.

Foram preparados padrões mistos de trabalho com todos os ácidos orgânicos adicionando-se volumes pré-definidos de cada solução-mãe de ácido, para balões volumétricos de capacidade adequada à concentração do padrão em preparação, seguindo o esquema pré-definido indicado na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 - Preparação de soluções de padrão misto de ácidos.

Padrão Misto	$V_{\text{balão}}$ (mL)	$V_{\text{S-m}}$ (mL)	C_{final} ($\mu\text{g/mL}$)		
			Oxálico	Ascórbico	Outros
O1	200	0,5	5	62,5	100
O2	100	0,5	10	125	200
O3	100	1	20	250	400
O4	100	2,5	50	625	1000
O5	20	1	100	1250	2000
O6	20	1,5	150	1875	3000

2.5.2. Amostragem e preparação das amostras

Cada variedade de hortofrutícolas foi cortada com sementes, cascas e talos em pedaços pequenos de cerca de 2 mm de modo a obter uma amostra o mais semelhante possível aos desperdícios gerados pela não comercialização ou pelo processamento fabril, mantendo a heterogeneidade da matriz até à extração de modo à amostragem ser o mais representativa possível dos subprodutos do processamento de hortofrutícolas.

As amostras foram devidamente acondicionadas em sacos com fecho, tendo-se definido uma massa de amostra de aproximadamente $250 \pm 0,05$ g, conforme o procedimento ilustrado na Figura 2.1. De seguida pesaram-se frações de $3 \pm 0,0005$

g de cada amostra de hortofrutícola para tubos de centrífuga graduados que foram armazenados na arca congeladora à temperatura de -20 °C até utilização.

As determinações de açúcares e ácidos orgânicos foram efetuadas em extratos resultantes de três extrações independentes para cada amostra de hortofrutícolas segundo procedimentos descritos na seção 2.5.3 que se encontra a seguir.



Figura 2.1 - Preparação de amostras dos hortofrutícolas. **(a)** Corte; **(b)** Acondicionamento em sacos de conservação; **(c)** Pesagem em tubos de centrífuga para extração.

2.5.3. Extração de açúcares e ácidos orgânicos

A extração de açúcares de amostras de hortofrutícolas foi adaptada da norma ISO 22662:2007 e para tal adicionou-se a cada amostra previamente pesada ($3,0 \pm 0,0005$ g), 20 mL de água *Milli-Q* morna. A mistura foi homogeneizada no *ultra-turrax* durante aproximadamente 1 minuto.

Em seguida, transferiu-se para balões volumétricos de 100 mL, adicionando-se ao respectivo balão 2 mL de solução *Carrez I* e 2 mL de solução *Carrez II* de modo a precipitar as proteínas e gorduras que interferem na análise (como ilustrado na Figura 2.2) e quando frio completou-se o volume do balão com água *Milli-Q*. O extrato obtido foi então filtrado com filtro de papel e uma alíquota do filtrado foi então

mais uma vez filtrada com filtro de seringa para *vial* devidamente identificado. Este procedimento foi realizado em triplicado para cada hortofrutícola.

Os *vials* devidamente identificados foram colocados no carrocel do injetor automático do HPLC e através da programação prévia do equipamento, os extratos preparados foram injetados em duplicado para detecção, identificação e quantificação dos açúcares presentes nos respectivos hortofrutícolas.



Figura 2.2 - Clarificação de extratos com soluções *Carrez* para determinação de açúcares.

A extração dos ácidos orgânicos da matriz dos hortofrutícolas foi realizada de acordo com o trabalho de Costa (2012), adicionando-se 20,0 mL do solvente de extração (solução de KH_2PO_4 , 0,05 M, a pH 2,8) a cada amostra previamente pesada ($3,0 \pm 0,0005$ g), efetuou-se uma homogeneização no *ultra-turrax* durante aproximadamente 1 minuto e colocou-se 2 minutos no ultra-sons para ponteciar a extração dos analitos. As misturas com volume de 23,0 mL foram depois centrifugadas durante 20 minutos a uma temperatura de 5 °C e à velocidade de 4500 rpm. De seguida, uma alíquota do sobrenadante foi filtrada com filtro de seringa para *vials* devidamente identificados. Este procedimento foi aplicado em triplicado para cada hortofrutícola. Cada extrato assim preparado foi injetado no equipamento de HPLC em duplicado para posterior detecção, identificação e quantificação dos ácidos orgânicos presentes nos hortofrutícolas.

2.5.4. Preparação das amostras para os ensaios de taxa de recuperação

Para os ensaios da taxa de recuperação foram selecionadas cinco matrizes hortofrutícolas, batata, cenoura, espinafre, laranja e maçã. Os ensaios foram realizados com adição de 2 mL de padrão misto à amostra pesada, na concentração de P4 ou P6 para os açúcares (Tabela 2.6) e em seguida procedeu-se à extração como descrito no ponto 2.5.3. Deste modo, a concentração de padrão presente nas amostras foi de 0,3 ou de 0,5 mg/mL.

Relativamente aos ácidos orgânicos foi igualmente adicionado 2 mL de padrão misto na concentração de O4 ou O6 (Tabela 2.7), seguida do procedimento de extração, estando a concentração de cada ácido adicionado às amostras apresentada na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 - Concentração de padrão misto adicionada nas amostras.

Analito	C _{adicionada} de O4 (mg/L)	C _{adicionada} de O6 (mg/L)
Oxálico	3	17
Tartárico	81	324
Lático	81	323
Ascórbico	72	150
Acético, cítrico e málico	81	323
Propiónico	74	324

2.5.5. Condições cromatográficas

Tal como descrito na seção 2.1, o equipamento de HPLC utilizado para a quantificação dos açúcares foi o da Linha 1, enquanto para a quantificação dos ácidos orgânicos se usou o sistema da Linha 2.

Para o estabelecimento das condições cromatográficas que se apresentam na Tabela 2.9 foi efetuada uma pesquisa bibliográfica que se resume no Anexo 1 e realizados estudos de otimização dos procedimentos analíticos, em termos de caudal, tempo de corrida, coluna, temperatura, pH e concentração da fase móvel. A determinação de açúcares nos hortofrutícolas foi definida pelos ensaios de otimização tendo por base o método AOAC 980.13 (1980), o referido por Choi *et al.*

(2015), Snow *et al.* (2015) e as condições sugeridas no manual da coluna *SugarPak*. As condições cromatográficas para a análise dos ácidos orgânicos foram adaptadas de Reuter (2015), Costa (2012), Scherer *et al.* (2012) e do manual da coluna.

Tabela 2.9 - Condições cromatográficas para determinação de açúcares e de ácidos orgânicos nos hortofrutícolas.

Parâmetros	Açúcares	Ácidos orgânicos
Coluna	<i>SugarPak</i>	<i>Aquasil C18</i>
Fase móvel (aquosa)	EDTA cálcio (0,01 mM)	KH ₂ PO ₄ (0,025 M a pH 2,4), ACN (1 %)
Eluição	Isocrática	Isocrática
Fluxo (mL/min)	0,6	0,8
Número de injeções	2	2
Volume de injeção (µL)	20	50
Tempo de corrida (min)	16	16
Detetor	IR	PDA
Comprimento de onda (nm)	–	210 e 254
Temperatura da coluna (°C)	70	30
Temperatura do detetor (°C)	30	–
Temperatura amostra (°C)	Ambiente	5

2.6. Identificação e quantificação dos analitos

A identificação dos analitos foi realizada por comparação dos picos dos cromatogramas dos extratos das amostras com os picos dos cromatogramas de soluções de padrão puro ou misto em idênticas condições experimentais, através da verificação dos tempos de retenção obtidos e, no caso dos ácidos orgânicos, também pela comparação dos espectros UV de cada analito.

A quantificação foi efetuada pelo método do padrão externo recorrendo-se a uma curva de calibração para cada açúcar e ácido orgânico que expressa a relação entre a concentração das soluções padrão e as áreas dos respectivos picos obtidos no cromatograma. Os tempos de retenção, as áreas dos picos e os espectros UV (ácidos orgânicos) foram obtidos com recurso ao *software* Millenium³².

As soluções dos padrões e os extratos das amostras foram introduzidas no sistema de HPLC tendo-se programado três injeções para cada solução de padrão misto e duas injeções para os extratos.

As equações das retas de calibração foram obtidas usando a média das áreas dos picos das três injeções de cada concentração de solução padrão utilizando a folha de cálculo Excel.

A concentração de cada um dos analitos nas amostras foi determinada através da reta de calibração de cada padrão de acordo com a equação 2.1.

$$C_{\text{analito}} = \frac{A - b}{m} \quad (2.1)$$

em que: C_{analito} - concentração do analito (g/L); A - área do pico do analito no cromatograma; b- ordenada na origem da reta de calibração; m - declive da reta de calibração. A concentração mássica do analito (g/100 g de amostra) pode ser determinada de acordo com a equação 2.2.

$$\%_{\text{analito}} = \frac{100 \cdot C_{\text{analito}} \cdot V \cdot F}{m_{\text{amostra}}} \quad (2.2)$$

em que: $\%_{\text{analito}}$ - % mássica do analito em g/100 g de amostra para cada extração independente, V - volume de extração, sendo 100 mL para a extração de açúcares e 23 mL para a extração de ácidos orgânicos; m_{amostra} - massa de amostra (g); F- fator de diluição. O teor de analito em g/100 g foi obtido pela média da $\%_{\text{analito}}$ para 3 extrações independentes de cada hortofrutícola.

Os cálculos para as retas de calibração, respetivos gráficos bem como para os teores de analito foram efetuados com recurso a folhas de cálculo Excel (versão 2010, Microsoft).

2.7. Parâmetros de validação do método

No decorrer deste trabalho foram analisados e validados os parâmetros que foram referidos e descritos na seção 1.8.1 do capítulo 1, com base no guia de validação da Relacre número 13 e nas regras de validação de métodos internos de análise do INIAV, bem como nas normas ISO 8466-1 (1990); ISO 8466-2 (1993) e ISO 11843-5

(2008). Apresentam-se na Tabela 2.10, os parâmetros que foram validados para os métodos de análise de açúcares e ácidos orgânicos aplicados no presente trabalho e o respectivo procedimento de validação.

Tabela 2.10 - Procedimentos de validação do método.

Parâmetros	Procedimento
Especificidade e Seletividade	Avaliada para cinco matrizes através dos testes das taxas de recuperação.
Gama de trabalho	A partir das soluções mãe de cada padrão foram preparadas sete e seis soluções de padrão misto de trabalho com as concentrações indicadas na seção 2.5.1, para açúcares (Tabela 2.6) e ácidos orgânicos (Tabela 2.7), respectivamente. Determinou-se a variância (S^2) dos dez resultados (sinais) referentes aos níveis de concentração mais baixa e mais elevada para os açúcares e ácidos orgânicos e realizou-se o teste de homogeneidade das variâncias.
Linearidade	Para a gama de trabalho definida foi avaliada a linearidade com três ensaios da curva de calibração. Depois de realizada a regressão linear foi efetuado o <i>Teste de Mandel (Teste de Fisher-Snedecor)</i> ; analisado o coeficiente de determinação e os resíduos obtidos.
Sensibilidade	A sensibilidade do método foi avaliada com base nos declives das curvas de calibração (equação 1.8) obtidas para os vários ensaios realizados durante a validação do método.
Limites analíticos (LQ e LD) e limites do método	Os limites analíticos de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados com base no desvio padrão residual da curva de calibração ($S_{y/x}$) e no respectivo declive da reta de calibração (equações 1.6 e 1.11 e 1.12). Estes limites, foram convertidos em % mássica (g/100g ou mg/100g amostra), tendo em conta a toma máxima possível e os fatores de diluição aplicados às diferentes amostras.
Repetibilidade	Envolveu a preparação e injeção de seis réplicas para os açúcares e quatro réplicas para os ácidos orgânicos da mistura de padrões a duas concentrações, em condições de repetibilidade (mesmo dia, mesmo equipamento, mesmo analista etc.), seguida da determinação dos respectivos desvios padrão e coeficiente de variação da repetibilidade (equações 1.13 e 1.14).

Parâmetros	Procedimento
Precisão Intermédia	Envolveu a preparação e injeção de seis réplicas para os açúcares e quatro réplicas para os ácidos orgânicos da mistura de padrões a duas concentrações, em condições de precisão intermédia (mesmo equipamento, mesmo analista, porém em dias diferentes entre análises), seguida da determinação dos respetivos desvios padrão e coeficiente de variação de precisão intermédia (equações 1.15 e 1.16).
Taxas de recuperação	Calculadas em cinco matrizes (batata, cenoura, espinafre, laranja e maçã) a dois níveis de concentração (seção 2.5.4).

2.8. Análise estatística e gráfica de resultados

Na validação de métodos foram utilizados os seguintes testes estatísticos:

Homogeneidade das variâncias: Comparação da variância das dez réplicas do primeiro (para alguns ácidos o segundo) e último padrão da curva de calibração. Este teste foi efetuado para três açúcares e um álcool de açúcar (sacarose, glucose, frutose e sorbitol) e oito ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, láctico, ascórbico, acético, cítrico, málico e propiónico).

Teste de Mandel: Análise da linearidade das curvas de calibração. O teste foi realizado para os mesmos analitos do teste anterior.

Análise dos parâmetros de curvas de calibração: Construção dos gráficos das curvas de calibração e análise de resíduos conforme apresentado no Anexo 2. Avaliação do coeficiente de determinação e de diversos parâmetros das curvas de calibração como desvios padrão, declive e ordenada na origem para um intervalo de confiança de 95%.

Os gráficos e cálculos foram realizados através das folhas de cálculo Microsoft Excel (versão 2010, da Microsoft) ou do *software* Statistica.

Os resultados dos teores de analito correspondem à média dos valores determinados para três extrações independentes de cada hortofrutícola e são apresentados em gráficos de colunas com barras de erro padrão e índices resultantes da aplicação, aos valores quantificados, da análise de variâncias (ANOVA *one-way*) com teste de *Scheffé* da diferença completamente significativa,

para $p < 0,05$ e $n=3$, utilizando o *software Statistica* (versão 7.0 da Stat Soft, Inc. 2004).

Efetou-se ainda uma avaliação geral e qualitativa do perfil de analitos obtido por hortofrutícola através da análise dos cromatogramas apresentados no Anexo 3 para todos os hortofrutícolas analisados.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como referido anteriormente, no presente trabalho procedeu-se à otimização e validação de métodos de HPLC para a determinação de açúcares e de ácidos orgânicos em matrizes hortofrutícolas de produtos descartados, ou resíduos/subprodutos gerados pelo processamento fabril de empresas parceiras do projeto *ProEnergy* e produtores de hortofrutícolas.

Procedeu-se à seleção e otimização de métodos de extração de açúcares e de ácidos orgânicos nas matrizes em estudo com base na pesquisa bibliográfica realizada (Anexo 1) e nos métodos em uso no laboratório do INIAV e optou-se por adaptar a norma ISO 22662:2007 para a extração de açúcares e o trabalho de Costa (2012) para a extração de ácidos orgânicos, cujos métodos de extração foram anteriormente adaptados no laboratório do INIAV para sumos de frutos.

A extração de açúcares e de ácidos orgânicos foi realizada em separado em três ensaios independentes por matriz de acordo com os procedimentos anteriormente descritos no capítulo 2, seção 2.5.3.

Inicialmente testou-se a determinação simultânea de açúcares e ácidos orgânicos numa mesma coluna cromatográfica com os detetores IR e PDA em série, tendo por base trabalhos anteriormente realizados no laboratório da UTI do INIAV em sumos de frutos. Não tendo sido possível a determinação simultânea destes analitos nas matrizes de hortofrutícolas decidiu-se pela análise em separado.

A quantificação de açúcares através de HPLC foi realizada por adaptação dos procedimentos e condições cromatográficas descritas no método de referência da AOAC 980-13-1980 (1990), bem como em Choi *et al.*, (2015), Snow *et al.* (2015) e nos manuais das colunas disponíveis no laboratório. Foram inicialmente testadas três colunas cromatográficas a *Rezex*, a *Carbohydrates* e a *SugarPak*, tendo-se decidido utilizar a coluna *SugarPak*.

A quantificação dos ácidos orgânicos foi adaptada com base nos procedimentos e condições cromatográficas descritas por Costa (2012), Reuter (2015), Scherer *et al.* (2012) e nos manuais das colunas. Testaram-se nesta quantificação as colunas *Aquasil C18* e *Synergi Hydro*, tendo sido escolhida a primeira que foi a coluna utilizada por Costa (2012).

A adaptação das técnicas de cromatografia foi efetuada em função do tipo de extração, coluna, fase móvel, detetor, comprimento de onda, tempo de corrida e temperatura.

3.1. Ensaios preliminares de análise conjunta de açúcares e ácidos orgânicos

Na sequência de trabalhos realizados no laboratório da UTI em sumos de frutos testaram-se colunas C18 para análise simultânea de açúcares e ácidos orgânicos. Foram avaliadas as colunas *NovaPak* e *Spherisorb ODS 2* no sistema de HPLC linha 1, descrito no capítulo 2, seção 2.1.

Por meio da Figura 3.1 (a) pode ser observado o cromatograma de uma mistura de três padrões de açúcar, sacarose, glucose e frutose (10 g/L), e na Figura 3.1 (b) o cromatograma de uma mistura de nove padrões de ácidos orgânicos, cítrico, málico, acético, láctico, oxálico, butírico, ascórbico, tartárico e propiónico de concentração 0,6 (Tabela 2.7), utilizando o detetor IR para detecção dos açúcares em série com o PDA para detecção dos ácidos orgânicos e usando a coluna *NovaPak* nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel KH_2PO_4 (0,05 M) a pH 2,8, ao fluxo de 0,35 mL/min, durante 30 minutos, volume de injeção de 20 μL e temperatura do forno de coluna 28°C.

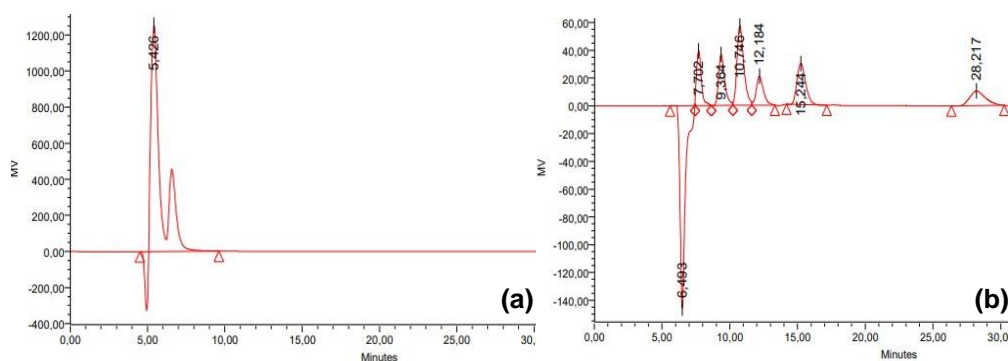


Figura 3.1 - Análise simultânea de açúcares e ácidos orgânicos, **(a)** detecção RI de açúcares; **(b)** detecção PDA de ácidos orgânicos a 210nm.

A análise simultânea de açúcares e ácidos orgânicos com detecção IR e PDA em série não mostrou especificidade e seletividade para os açúcares testados pois foram injetados três açúcares e não se obteve três picos bem definidos, também

para os ácidos orgânicos não se obteve seletividade e especificidade pois foi injetada uma mistura de nove ácidos e o cromatograma obtido não apresenta nove picos. Por este método não foi possível separar os três açúcares predominantes nos hortofrutícolas (sacarose, glucose e frutose) e só se conseguiram separar seis dos oito ácidos orgânicos injetados, assim optou-se por realizar a separação destes compostos segundo dois métodos diferentes um para separação para açúcares e outro para ácidos orgânicos, como acontece em muitos dos artigos publicados (Andrés *et al.*, 2015; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2012 e Shaw e Wilson, 1981).

3.2. Validação dos métodos cromatográficos

Com o objetivo de analisar as amostras de hortofrutícolas em estudo, bem como determinar com certo nível de precisão e exatidão os teores de açúcares e ácidos orgânicos presentes nestas matrizes procedeu-se à validação dos métodos cromatográficos selecionados de acordo com o guia da Relacre 13. Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, gama de trabalho, linearidade, limite de deteção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade, precisão intermediária e taxa de recuperação. Os procedimentos de validação adotados para cada parâmetro, encontram-se descritos e apresentados na Tabela 2.10, bem como no tópico 1.8.1 deste trabalho.

3.2.1. Validação do método para quantificação de açúcares

Identificação dos açúcares

Para quantificar os vários açúcares nas diferentes matrizes hortofrutícolas que, por vezes, podem ser bastante complexas e possuírem na sua constituição compostos interferentes, é muito importante averiguar se o método de análise que vai ser utilizado é específico para o(s) analito(s) em questão. Neste sentido procedeu-se à injeção das soluções mãe dos açúcares individuais (concentração de 40 g/L para estaquiiose e lactose, 100 g/L para manitol e 150 g/L para os outros açúcares) e fez-se uma sobreposição dos respetivos cromatogramas de modo a comparar os tempos de retenção de cada um dos açúcares e/ou verificar possíveis interferências como ilustrado na Figura 3.2.

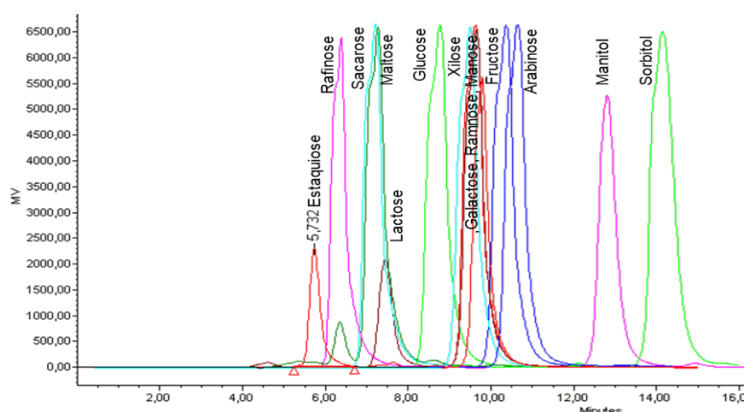


Figura 3.2 - Sobreposição de cromatogramas de açúcares (estaquiouse, rafinose, sacarose, maltose, lactose, glucose, xilose, galactose, ramnose, manose, fructose, arabinose, manitol e sorbitol).

Procedeu-se ainda à injeção de várias soluções individuais de padrões de açúcar, na gama de concentrações de 1,0 a 30,0 g/L, de modo a verificar o tempo de retenção médio de cada um deles e a existência de um único pico referente ao analito de interesse, valores que se apresentam na Tabela 3.1 com respetivo desvio padrão, para uma média de três injeções nas condições cromatográficas da Tabela 2.9.

Tabela 3.1 - Tempos de retenção médio dos padrões de açúcares e desvio padrão (S).

Padrão	Tempo de retenção ± S (min)
Estaquiouse	5,73 ± 0,02
Rafinose	6,30 ± 0,10
Sacarose	7,08 ± 0,03
Maltose	7,17 ± 0,10
Lactose	7,44 ± 0,01
Glucose	8,66 ± 0,03
Manose	9,70 ± 0,05
Fructose	10,30 ± 0,16
Arabinose	10,54 ± 0,11
Manitol	12,18 ± 0,01
Sorbitol	14,27 ± 0,09

A partir da análise dos cromatogramas sobrepostos na Figura 3.2 foi possível verificar que existem vários açúcares cujos tempos de retenção são muito semelhantes, prevendo-se interferências na análise conjunta destes compostos utilizando a coluna *SugarPack*. É o caso da sacarose, maltose e lactose que eluem nesta coluna praticamente no mesmo tempo de retenção. No entanto, a lactose e a maltose como são açúcares específicos de produtos lácteos e cereais, respetivamente, não são interferentes na determinação de sacarose em hortofrutícolas que é um dos açúcares predominante nestas matrizes. Também xilose, galactose, ramnose e manose apresentaram um pico conjunto pelo que o método não se mostrou adequado para análise destes açúcares.

No caso da determinação de frutose pode existir interferência pela arabinose que apresenta um tempo de retenção muito próximo. No entanto esta interferência não foi considerada nas análises por a arabinose não ser um açúcar predominante nos hortofrutícolas. Estaquiose e rafinose são açúcares encontrados naturalmente em alguns hortícolas e quantificados na análise de hortofrutícolas (Lee *at al.* 1970). No entanto, neste trabalho a análise destes açúcares ficou comprometida devido à existência de compostos interferentes com os picos da estaquiose e rafinose, o que pode ser observado no Anexo 3, onde os cromatogramas das amostras analisadas apresentam um pico inicial que contém os tempos de retenção de estaquiose e rafinose.

Pode ainda observar-se pela sobreposição dos cromatogramas dos padrões mistos que contêm a mistura de sacarose, glucose, frutose, manitol e sorbitol em diferentes concentrações (1 a 30 g/L, linhas com cores diferentes) obtidos nas condições cromatográficas da Tabela 2.9 e apresentados na Figura 3.3 e, por exemplo, pela análise do perfil de açúcares na amostra de ameixa amarela constante na Figura A3.5 do Anexo 3, que os picos dos cinco açúcares se apresentaram bem separados, podendo afirmar-se que o método é adequado à identificação de sacarose, glucose, frutose, manitol e sorbitol.

Os alcóois de açúcar analisados nas matrizes inicialmente estudadas, quando identificados, apresentaram quantidades vestigiais e na pesquisa bibliográfica realizada (Anexo 1) poucos autores apresentaram a determinação de manitol neste tipo de matrizes, motivo pelo qual, se optou por apenas validar o método para a determinação de sorbitol e apresentar somente a identificação de manitol. Foi

verificada a presença de sorbitol em 33% dos hortofrutícolas analisados enquanto o manitol apenas esteve presente em 23% das amostras.

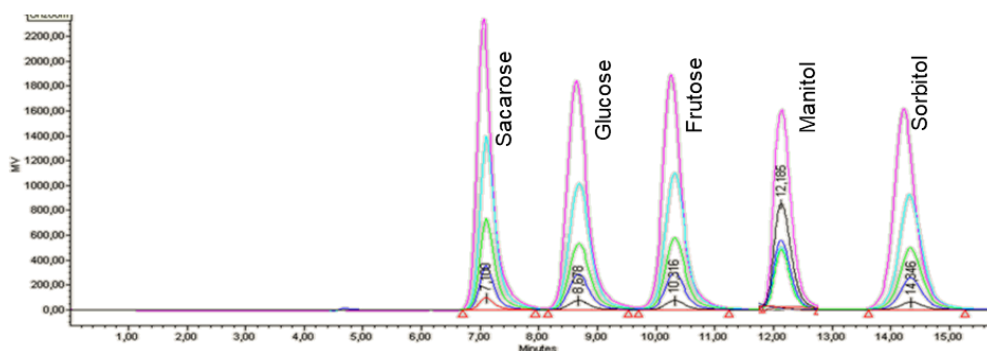


Figura 3.3 - Sobreposição dos cromatogramas de padrões mistos de sacarose, glucose, frutose, manitol e sorbitol. Concentração maior a rosa (30 g/L) e menor a preto (1 g/L).

Seletividade e especificidade

A seletividade e a especificidade do método analítico podem ser avaliadas através da comparação de uma matriz contendo o analito de interesse com uma matriz isenta. Esta análise permite verificar se na matriz isenta do analito de interesse no tempo de retenção deste, haverá qualquer pico que possa ser considerado interferente na análise. O método analítico pode ainda ser considerado específico e seletivo quando se confirmam percentagens de recuperação próximas de 100% (Relacre, 2000).

Neste sentido, para averiguar o efeito de possíveis interferentes, realizaram-se testes de recuperação em amostras de batata, cenoura, espinafre, laranja e maçã, variando a concentração de adição de analito em proporções conhecidas a dois níveis de concentração (0,3 g/L e 0,5 g/L), tendo sido analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade (Relacre, 2000).

Os resultados obtidos encontram-se descritos no tópico taxas de recuperação e demonstram que o método pode ser considerado seletivo e específico uma vez que se confirmaram percentagens de recuperação aceitáveis.

Gama de trabalho

Para a validação da gama de trabalho a utilizar foram avaliados para cada analito os intervalos de concentração entre 1,0 g/L e 30,0 g/L que foram definidos com base na

avaliação efetuada da percentagem de açúcares em frutos e vegetais constante na Tabela 1.2 e também na tabela de composição de alimentos (INSA, 2019).

A validação da gama de trabalho para modelos de calibração linear envolve a análise dos padrões correspondentes às concentrações mínima e máxima como descrito no tópico *gama de trabalho* do ponto 1.8.1 e referido na Tabela 2.10.

Deste modo foi efetuado o estudo da homogeneidade das variâncias em dez réplicas independentes dos padrões de maior e menor concentração de sacarose, glucose, frutose e sorbitol. Este teste foi realizado com recurso à folha de cálculo Excel cujo exemplo se apresenta para sacarose na Tabela A4.1.1 do Anexo 4. Os resultados de sinal obtidos para as dez repetições do primeiro e último padrão de cada açúcar encontram-se apresentados na Tabela A4.1.2 do Anexo 4, bem como as respetivas variâncias (S_i^2) calculadas a partir das equações 1.1 e 1.2. Em seguida, procedeu-se ao cálculo de PG, recorrendo à equação 1.3, cujos resultados se apresentam na Tabela 3.2, os quais foram comparados com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fisher* para N-1 (nove) graus de liberdade e intervalo de confiança de 99% ($F = 5,351$).

Tabela 3.2 - Valores de PG para avaliação da validade da gama de trabalho.

	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol
PG	3,979	4,722	5,226	5,198

Pela análise dos resultados verifica-se que PG é menor do que F pelo que se pode concluir que para a gama de trabalho estudada se verificou homogeneidade das variâncias. Confirmou-se desta forma que os intervalos estão ajustados e validados pois não existem diferenças significativas entre as variâncias.

Linearidade

Para a avaliação da linearidade da gama de trabalho, procedeu-se à construção de várias curvas de calibração para os açúcares a analisar, os quais se apresentam no Anexo 2. Deste modo, preparou-se uma solução mãe padrão de cada composto individualmente, que se utilizou para preparar padrões mistos de acordo com as condições descritas na Tabela 2.6. Estes padrões mistos foram injetados no HPLC, analisados nas condições cromatográficas descritas para análise de açúcares. A

partir do sinal medido pelo detetor procedeu-se à construção de curvas de calibração para sacarose, glucose, frutose e sorbitol as quais permitiram estabelecer a relação entre o sinal medido (área do pico no tempo de retenção do açúcar) e a concentração do açúcar na solução padrão.

Para avaliar a linearidade do método com base na curva de calibração em que y representa a área do pico e x o teor do analito em g/L, calcularam-se o coeficiente de determinação (R^2) que irá indicar a qualidade do ajuste obtido e o coeficiente de correlação de Pearson (R) que avalia a relação linear entre a área dos picos e a concentração do analito. De acordo com os principais guias de validação de métodos analíticos, estes parâmetros devem ser superiores a 0,995; critério de aceitação da linearidade da gama de trabalho, o que foi sempre cumprido ao longo dos vários ensaios e cujos valores podem ser observados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Retas de calibração, coeficiente de correlação (R^2) e de determinação (R) para análise dos açúcares.

Analito	Reta de calibração	R^2	R
Sacarose	$y = 1492932,9 x + 270178,9$	0,9998	0,9999
Glucose	$y = 1384249,5 x + 318717,5$	0,9992	0,9996
Frutose	$y = 1543004,6 x + 5733,8$	0,9977	0,9988
Sorbitol	$y = 1424985,9 x + 50709,5$	0,9989	0,9995

Adicionalmente foi efetuada uma análise dos resíduos percentuais gerados para cada padrão das curvas de calibração construídas para os vários açúcares que constam do Anexo 2. A percentagem máxima de erro de 10% para aceitação dos resíduos dos diferentes pontos da curva de calibração está definida pelo controlo de qualidade interno do INIAV. $\leq 10\%$

Através de uma análise visual dos gráficos de resíduos verificou-se que não houve nenhuma violação à hipótese de linearidade, visto que os seus valores se dispersaram numa banda horizontal em torno do zero até $\pm 5\%$, não existindo pontos atípicos influentes. Sempre que necessário, foram construídas curvas de calibração e analisados os respectivos resíduos e o coeficiente de determinação como critérios para a aceitação das curvas de calibração.

Em seguida foi ainda realizado o teste estatístico de *Mandel* como indicado pela norma ISO 8466-1 (1990) para demonstrar a adequabilidade da função de

calibração a um modelo linear comparativamente a um ajuste polinomial. No Anexo 5 está apresentado um exemplo da folha de cálculo usada para a aplicação do teste de *Mandel* aos resultados obtidos para a sacarose. O teste foi também realizado para os outros açúcares.

Através da razão da diferença das variâncias (DS^2) de ambos os ajustes (equação 1.8) e do desvio padrão residual do ajuste polinomial, foi calculado o valor de PG (equação 1.9) para cada curva de calibração cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.4. os quais foram comparados com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fisher* para N-3 graus de liberdade, N=11 pontos de calibração e intervalo de confiança de 99% ($F = 11,259$).

Tabela 3.4 - Resultados do teste de *Mandel* para avaliação da linearidade das curvas de calibração dos açúcares.

	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol
DS²	$7,68 \times 10^{13}$	$5,05 \times 10^{14}$	$5,96 \times 10^{14}$	$3,07 \times 10^{14}$
PG	1,362	8,945	8,824	8,932

Através da análise dos resultados verifica-se que o valor de PG foi inferior ao valor F de *Snedecor/Fisher*, sendo assim, concluiu-se que existe um bom ajuste dos pontos podendo ser utilizado o modelo de calibração linear para análise dos açúcares.

Sensibilidade

A sensibilidade foi avaliada com base nos declives das retas de calibração de acordo com a equação 1.10. Foi determinada a média dos declives, calculado o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) (por adaptação das equações 1.13 e 1.14), valores que se apresentam na Tabela 3.5, por ordem decrescente de sensibilidade.

A partir dos resultados obtidos verifica-se que a determinação de frutose é a mais sensível e a de glucose a que apresenta menor sensibilidade. Os baixos valores do coeficiente de variação obtidos, permite concluir que o método manteve sensibilidade constante ao longo dos vários ensaios de calibração.

Tabela 3.5 - Sensibilidade do método de determinação de açúcares e respetivos desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV).

Analito	Sensibilidade UA/(g/L)	Desvio padrão (S) UA/(g/L)	CV %
Frutose	1543004,6	17618,5	1,1
Sacarose	1492932,9	4062,3	0,3
Sorbitol	1424985,9	12987,5	0,9
Glucose	1384249,5	9265,8	0,7

Limites analíticos

Neste trabalho optou-se por definir os limites analíticos de deteção (LD) e de quantificação (LQ), pela aplicação das equações 1.11 e 1.12, respetivamente, estando os resultados apresentados na Tabela 3.6 em g/L.

Foram ainda calculados os limites do método em g/100g, por aplicação da equação 2.2 aos limites analíticos, considerando 3 g de amostra e 100 mL de volume de extração, tendo-se obtido os valores apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Limites analíticos (g/L) e limites do método (g/100g) de análise dos açúcares.

Analito	LD (g/L)	LQ (g/L)	LD (g/100g)	LQ (g/100g)
Sacarose	0,17	0,51	0,56	1,70
Glucose	0,40	1,21	1,33	4,04
Frutose	0,63	1,91	2,10	6,38
Sorbitol	0,59	1,78	1,95	5,92

Conforme se observa na tabela acima, o limite de quantificação calculado para a sacarose foi inferior ao primeiro ponto da curva de calibração (1,00 g/L), no entanto, em relação à glucose, frutose e sorbitol, os limites de quantificação calculados (1,21 g/L; 1,91 g/L; e 1,78 g/L) foram superiores ao primeiro ponto da gama de trabalho que dada a homogeneidade das variâncias, poderia ser considerado como limite de quantificação.

Precisão

De acordo com o guia da Relacre 13 (2000) os ensaios de precisão podem ser realizados sobre amostras ou padrões, tendo-se optado por determinar este parâmetro apenas em padrões. Devido à grande variabilidade das matrizes em estudo neste trabalho, não seria viável o uso de amostras, pois seria necessário que o procedimento fosse repetido sobre as várias matrizes e em vários níveis de concentração, cobrindo todo o domínio de aplicação do método, para minimizar efeitos de matriz.

Para os ensaios de precisão, optou-se por avaliar a repetibilidade e precisão intermédia em padrão misto contendo sacarose, glucose frutose e sorbitol em duas gamas de concentração (10 g/L e 30 g/L) de modo a verificar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes.

O ensaio de **repetibilidade** consistiu na realização de um ensaio sob um conjunto de condições operatórias constantes, ou seja, em condições de repetibilidade (mesmo dia, mesmo equipamento, mesmo analista, mesmo laboratório e curtos intervalos de tempo) em que se efetuaram N=6 injeções independentes. Os desvios padrão relativos (S_{ri}) e os coeficientes de variação de repetibilidade (CV_r) foram calculados através das equações 1.13 e 1.14, valores que se encontram apresentados nas Tabela 3.7 (concentração 10 g/L) e Tabela 3.8 (concentração 30 g/L), valores que foram obtidos através de folhas de cálculo como a apresentada no Anexo 6.

Tabela 3.7 - Desvio padrão (S_{ri}) e coeficiente de variação (CV_r) de repetibilidade na concentração de 10 g/L.

	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol
S_{ri} (g/100g)	0,7	1,4	1,0	0,9
CV_r (%)	2,2	4,0	3,2	2,7

Pela análise da Tabela 3.7 verifica-se que a sacarose apresentou o menor coeficiente de variação de repetibilidade (2,2%) seguido de sorbitol, frutose e glucose, todos com valores inferiores a 5%.

Tabela 3.8 - Desvio padrão (S_{ri}) e coeficiente de variação (CV_r) de repetibilidade na concentração de 30 g/L.

	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol
S_{ri} (g/100g)	4,7	3,8	3,8	3,9
CV_r (%)	4,5	3,7	3,7	3,8

Segundo a Tabela 3.8, glucose e frutose apresentaram o menor coeficiente de variação de repetibilidade seguidos pela sorbitol e sacarose, sendo o seu valor para todos os açúcares, inferior a 5%.

Por sua vez, a **precisão intermédia** do método foi avaliada sobre os mesmos padrões e concentrações utilizando os mesmos parâmetros, desvio padrão relativo (S_{Ri}) e coeficiente de variação (CV_R), porém em condições de precisão intermédia, isto é, variando os dias de análise, em média com um intervalo de dois dias entre cada injeção num total de seis injeções, valores obtidos através das equações 1.15 e 1.16 de acordo com o apresentado nas folhas de cálculo constantes no Anexo 6 e apresentados na Tabela 3.7 (concentração 10 g/L) e na Tabela 3.8 (concentração 30 g/L).

Tabela 3.9 - Desvio-padrão relativo (S_{Ri}) e coeficiente de variação (CV_R) de precisão intermédia na concentração de 10 g/L.

	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol
S_{Ri} (g/100g)	1,3	1,7	1,7	1,0
CV_R (%)	4,2	5,1	5,3	3,1

Os resultados da Tabela 3.9 mostram que o sorbitol, apresentou o menor coeficiente de variação de precisão intermédia (3,1%) seguido de sacarose, glucose e frutose.

Conforme se observa na Tabela 3.10 o menor coeficiente de variação de precisão intermédia foi apresentado pela frutose (3,3%) seguida de sorbitol, glucose e sacarose.

Tabela 3.10 - Desvio-padrão relativo (S_{Ri}) e coeficiente de variação (CV_R) de precisão intermédia na concentração de 30 g/L.

	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol
S_{Ri} (g/100g)	5,1	5,0	3,3	4,1
CV_R (%)	5,2	4,8	3,3	4,1

Globalmente os resultados obtidos da análise da precisão mostraram que o método foi preciso para os açúcares analisados, tendo-se atingido um coeficiente de variação máximo de 4,5% para a repetibilidade e de 5,3% para a precisão intermédia, valores que são inferiores ao limite estabelecido no guia de controlo de qualidade interno do INIAV (10%). É de realçar que estes resultados exprimem a variabilidade das concentrações obtidas nos vários ensaios, sendo para o nível de concentração mais elevada, maior para a sacarose em ambos os ensaios de precisão, possivelmente por questões de menor solubilidade da sacarose (Crestani *et al.*, 2018).

Taxa de recuperação

A determinação da taxa de recuperação envolve a adição de quantidades conhecidas do analito à amostra e tem como finalidade avaliar a fração de analito adicionada que foi efetivamente detetada pelo método de ensaio. Os ensaios foram realizados nas amostras de batata, cenoura, espinafre, laranja e maçã de acordo com o descrito na seção 2.5.4. O cálculo da percentagem de recuperação foi efetuado com base na equação 1.17 em dois níveis de concentração (P4 e P6) para as cinco matrizes mencionadas, estando os resultados da média dos valores obtidos apresentados na Tabela 3.11. Os cálculos intermédios foram efetuados em folhas de cálculo, apresentando-se no Anexo 7 um exemplo de aplicação para a maçã.

Tabela 3.11 - Taxas de recuperação médias, TR (%) para os açúcares.

TR (%)	Batata	Cenoura	Espinafre	Laranja	Maçã
Sacarose	94,7	90,4	88,5	85,7	88,6
Glucose	77,7	92,8	88,7	109,8	103,8
Frutose	85,5	85,4	81,3	98,6	102,9
Sorbitol	86,0	92,6	98,5	89,6	91,4

De um modo geral, os valores das taxas de recuperação são aceitáveis pois estão, na sua maioria, dentro do critério estabelecido internamente no INIAV (80 a 120%). Apenas para a glucose na batata se obteve uma taxa de recuperação que não cumpre o critério (78%), desvio que pode dever-se à complexidade da matriz.

Globalmente os resultados obtidos da validação do método para a determinação dos açúcares na matriz dos hortofrutícolas mostraram ser satisfatórios para grande parte dos parâmetros validados, tendo a glucose, a frutose e o sorbitol apresentado limites de quantificação superiores ao primeiro ponto da gama de trabalho estudada. A escolha inicial da gama de trabalho foi planeada tendo em conta as concentrações de açúcares nos frutos constantes na bibliografia inicialmente consultada, no entanto, alguns hortofrutícolas apresentam concentrações vestigiais de açúcares, pelo que se pretendia posteriormente estudar uma gama de concentrações mais baixa, de 0,1 a 5,0 g/L, trabalho que não foi possível concretizar devido ao grande volume de ensaios necessários para a quantificação dos ácidos orgânicos.

3.2.2. Validação do método quantificação de ácidos orgânicos

Identificação dos ácidos orgânicos

Para identificar os vários ácidos orgânicos presentes nas diferentes amostras de hortofrutícolas foram injetados padrões de ácidos orgânicos individualmente com a concentração de 06 (Tabela 2.7) de modo a verificar a ordem de eluição, bem como, a existência de um único pico referente ao analito de interesse. Após obter os vários cromatogramas dos ácidos orgânicos individuais fez-se uma composição destes como ilustrado na Figura 3.4. Os cromatogramas foram obtidos com fase móvel constituída por KH_2PO_4 (0,05 M a pH 2,8) sem acetonitrilo, com base nos resultados de Costa (2012), fase esta que foi posteriormente otimizada para as condições mencionadas na Tabela 2.9 (KH_2PO_4 , 0,025 M a pH 2,4 com 1% de acetonitrilo).

A partir da análise da composição dos cromatogramas foi possível verificar que alguns ácidos orgânicos eluem a tempos de retenção próximos e apresentam picos estreitos e bem definidos (com exceção do ácido propiónico que apresenta um pico com *tailing*, em oposição aos dos açúcares que apresentam picos mais largos, tornando possível a separação destes ácidos com tempos de retenção mais próximos.

Sabendo que os ácidos são fortemente influenciados pelo pH e que alguns ácidos orgânicos possuem mais de uma constante de dissociação ácida (pK_a), verifica-se pela análise da Figura 3.4 que todos os ácidos à exceção do málico apresentam um único pico ao pH da análise. No caso do ácido málico o seu cromatograma

apresenta mais de um pico devido à coexistência de várias formas de dissociação ácida ao pH da análise.

Costa em 2012 verificou que a soma das áreas da integração dos vários picos do analito equivalia à sua concentração total, no entanto apenas integrou o pico mais expressivo para a quantificação de compostos que apresentavam vários picos com bons resultados.

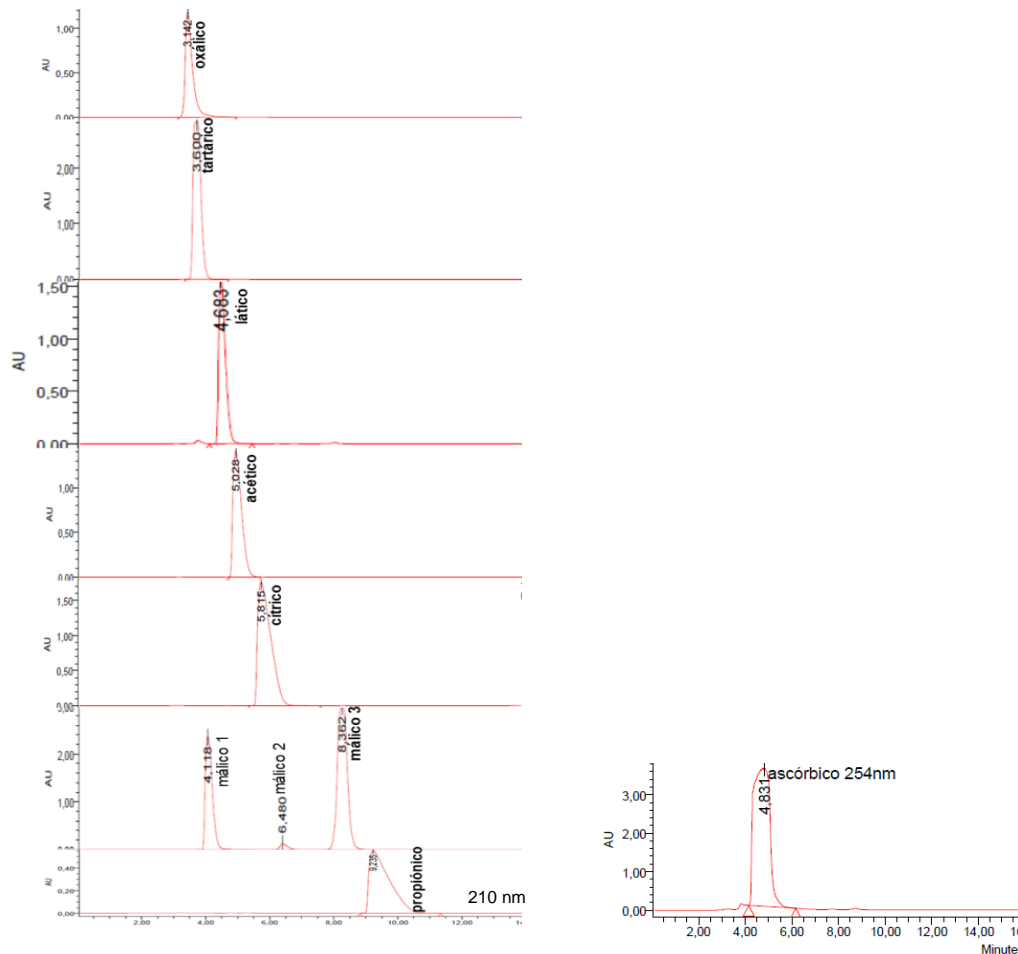


Figura 3.4 - Cromatogramas de padrões individuais de ácidos orgânicos, integração a 210 nm e 254 nm (ácido ascórbico).

Para quantificar os vários ácidos orgânicos presentes nas amostras de hortofrutícolas foram injetados padrões mistos de ácidos orgânicos nas concentrações O3 a O6 mencionadas na Tabela 2.7, de modo a verificar o tempo de retenção de cada um deles. Apresenta-se na Tabela 3.12 o tempo de retenção médio obtido a partir de três injeções de padrão misto bem como o respectivo desvio padrão e na Figura 3.5 apresentam-se os cromatogramas sobrepostos da mistura dos oito ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, láctico, ascórbico, acético, cítrico, málico

e propiónico) obtidos nas condições cromatográficas da Tabela 2.9, as diferentes cores indicam diferentes concentrações.

Tabela 3.12 - Tempo de retenção médio dos padrões de ácidos orgânicos e desvio padrão (S).

Padrão	Tempo de retenção ± S (min)
Oxálico	2,98 ± 0,35
Tartárico	3,34 ± 0,40
Lático	4,13 ± 0,27
Ascórbico	4,44 ± 0,12
Acético	4,59 ± 0,36
Cítrico	6,16 ± 0,43
Málico	8,34 ± 0,45
Propiónico	9,90 ± 0,65

Conforme seria de esperar, os picos de cada analito para as diferentes concentrações de padrão possuem tempos de retenção semelhantes em idênticas condições experimentais. Confirma-se, assim, a possibilidade de usar os tempos de retenção da Tabela 3.12 na análise, dos diferentes ácidos nos hortofrutícolas cujo teor nestes compostos é muito variado.

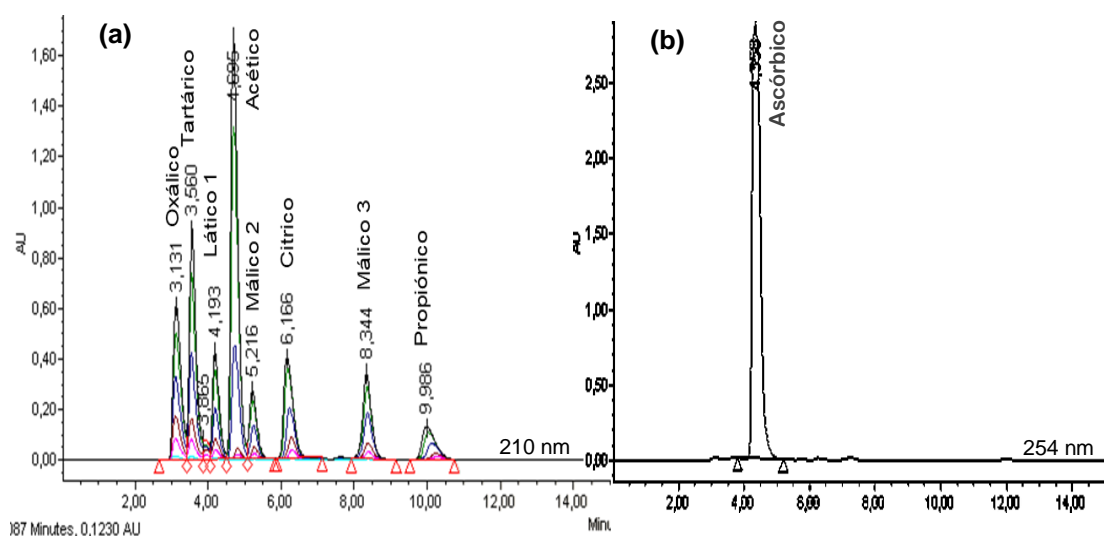


Figura 3.5 - Cromatogramas da mistura padrão de ácidos orgânicos, a preto a concentração O6 (a) 210 nm; (b) 254 nm.

Deve ainda salientar-se que, com este método, se obtém a separação de oito ácidos em cerca de 12 a 16 minutos, enquanto outros autores obtêm a separação de menor número de ácidos em tempos mais longos. Costa em 2012 separou apenas cinco ácidos em maior tempo de corrida (40 minutos) usando a mesma coluna e tipo de fase móvel (KH_2PO_4) mas com concentração mais elevada e maior pH.

Com efeito, considerando que o tempo de retenção depende da concentração, composição (% de adição de modificador, acetonitrilo) e pH da fase móvel, no presente trabalho realizaram-se ensaios preliminares em que foi variada a concentração e o pH da fase móvel, tendo-se obtido menores tempos de retenção com boa separação dos analitos com KH_2PO_4 a 0,025 M e pH 2,4, alterações que foram selecionadas neste trabalho e constam da Tabela 2.9. Nestas condições o tempo de corrida de 16 minutos mostrou ser suficiente para separar, detetar, identificar e quantificar os oito ácidos orgânicos em estudo, havendo margem para pequenas variações na pressão, no pH da fase móvel ou na solução de extração, tendo em conta que o último ácido elui por volta dos 9 minutos.

Os ácidos orgânicos foram quantificados a 210 nm (Reuter 2015) com exceção do ácido ascórbico, que por apresentar um comprimento máximo de absorção por volta dos 264 nm (EN 14130, 2003) se quantificou a 254 nm como descrito por Khosravi *et al.* (2015). Optou-se por analisar o ácido ascórbico, apesar de ser um ácido fenólico, por ser um composto recorrente em hortofrutícolas principalmente em citrinos e bastante determinado na literatura (Walker e Famiani 2018; Khosravi *et al.*, 2015; Scherer *et al.* 2012).

Verificou-se assim que ao comprimento de onde de 210 nm não foi possível identificar o ácido ascórbico, pois o seu pico não tem expressividade em relação aos picos dos outros ácidos, Figura 3.5 (a). No entanto, quando se integrou o cromatograma da mistura de padrões a 254 nm, Figura 3.5 (b) foi possível identificar o ácido ascórbico não apresentando os outros ácidos picos significativos. Decidiu-se assim quantificar este ácido pela integração do pico a 254 nm e os outros ácidos a 210 nm.

Comparando o cromatograma do padrão misto, Figura 3.5 (a) com o cromatograma da injeção do ácido málico puro, Figura 3.4, foi possível observar que o pico obtido para o ácido málico¹ não ficou evidenciado na Figura 3.5 e que em ambas as figuras

o pico mais expressivo é o málico 3. Deste modo optou-se por quantificar o ácido málico pela integração do maior pico, isto é, ao tempo de retenção do málico 3.

Seletividade e especificidade

Dada a complexidade da matriz dos hortofrutícolas é importante averiguar se o método de análise que vai ser utilizado é específico e seletivo para o(s) analito(s) de interesse. Conforme referido anteriormente o método analítico pode ser considerado específico e seletivo quando se confirmam percentagens de recuperação próximas de 100% (Relacre, 2000).

Neste sentido, realizaram-se testes de recuperação de acordo com o descrito no tópico 2.5.4 variando a concentração de adição de analito em proporções conhecidas a dois níveis de concentração (adição de 2 mL de padrão misto O4 ou O6), tendo sido analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade. Os resultados obtidos nestas análises encontram-se descritos na Tabela 3.23 do tópico taxas de recuperação e demonstram que o método pode ser considerado seletivo e específico uma vez que se confirmam percentagens de recuperação aceitáveis.

Gama de trabalho

Para a validação da gama de trabalho a utilizar na análise dos ácidos orgânicos foram avaliados, para cada ácido, os intervalos de concentração apresentados na Tabela 3.13 que foram definidos com base no trabalho desenvolvido por Costa (2012) no INIAV, em que foram validadas gamas de trabalho apenas para os ácidos oxálico, láctico, propiónico e butírico.

A validação da gama de trabalho para modelos de calibração linear envolve a análise dos padrões correspondentes às concentrações mínima e máxima como descrito no tópico *gama de trabalho* do ponto 1.8.1.

Deste modo, foi efetuado o estudo da homogeneidade das variâncias para os ácidos orgânicos, cujos resultados se apresentam na Tabela 3.14, apresentando-se no Anexo 4, tabela A4.2.1, o exemplo da folha de cálculo *Excel* para o ácido cítrico. Para este teste, foram efetuadas N=10 injeções repetidas, do primeiro e último padrão da gama de trabalho de cada ácido, cujos resultados se encontram nas

Tabelas A4.2.2 bem como as respectivas variâncias (S_i^2), calculadas a partir das equações 1.1 e 1.2.

Tabela 3.13 - Gama de trabalho para análise de ácidos orgânicos.

Analito	Gama de trabalho (mg/L)
Oxálico	5,43 – 217
Tartárico	101 – 4047
Lático	121 – 4035
Ascórbico	62,6 – 1878
Acético	101 – 4037
Cítrico	101– 4035
Málico	101 – 4027
Propiónico	101 – 4049

Averiguou-se a existência ou não de homogeneidade das variâncias na gama de trabalho de cada ácido recorrendo ao cálculo de PG por aplicação da equação 1.3, que foi verificada com o primeiro ponto da reta de calibração para os ácidos oxálico, tartárico, ascórbico, málico e propiónico mas apenas com o segundo ponto para os restantes ácidos. Na Tabela 3.14 apresenta-se o primeiro ponto (mg/L) da gama de trabalho validada, bem como o resultado obtido para PG que foi comparado com o valor tabelado da distribuição de *Snedecor/Fisher* para N-1 graus de liberdade com intervalo de confiança de 99% ($F= 5,351$).

Tabela 3.14 - Valores de PG e concentração da gama de trabalho validada.

	Oxálico	Tartárico	Lático	Ascórbico	Acético	Cítrico	Málico	Propiónico
(mg/L)	5,43	101	242	62,6	202	202	101	101
PG	5,227	5,088	5,324	5,293	5,276	5,208	5,349	5,207

Pela análise dos resultados verifica-se que PG é menor do que F, a partir da concentração da gama de trabalho indicada na Tabela 3.14, pelo que se pode concluir para as gamas de trabalho em avaliação que não existem diferenças significativas entre as variâncias e as gamas de trabalho estão ajustadas.

Linearidade

Para a avaliação da linearidade da gama de trabalho foram injetados no sistema de HPLC sob as mesmas condições em que seriam analisadas as amostras de hortofrutícolas, soluções de padrões mistos preparadas nas concentrações descritas na Tabela 2.7. Procedeu-se à construção das curvas de calibração para cada ácido a analisar estabelecendo-se a relação entre o sinal medido e a concentração do ácido na solução padrão.

A partir das retas de calibração obtidas para os diferentes ácidos, foram avaliados os coeficientes de determinação (R^2) e de correlação (R) cujos valores devem ser superiores a 0,995 para se poder confirmar a linearidade da gama de trabalho. Este critério foi sempre cumprido ao longo dos vários ensaios como pode ser observado na Tabela 3.15 onde se apresentam as equações das curvas de calibração. Podem observar-se no Anexo 2 os gráficos e parâmetros da calibração bem como os gráficos da análise dos resíduos percentuais gerados para cada padrão de cada uma das curvas.

Tabela 3.15 - Retas de calibração, coeficiente de correlação (R^2) e de determinação (R) dos ácidos orgânicos

Analito	Reta de calibração	R^2	R
Oxálico	$y = 19011,6 x - 11403,2$	0,9972	0,9986
Tartárico	$y = 3940,2 x - 251344,9$	0,9972	0,9986
Lático	$y = 12641,2 x - 887541,3$	0,9993	0,9997
Ascórbico	$y = 35044,4 x + 5654235,0$	0,9992	0,9996
Acético	$y = 1178,0 x - 203895,0$	0,9956	0,9978
Cítrico	$y = 2530,3 x - 310662,3$	0,9974	0,9987
Málico	$y = 4245,0 x - 373389,8$	0,9960	0,9980
Propiónico	$y = 1190,5 x - 99303,6$	0,9978	0,9989

y = área do pico do analito e x = teor do analito em mg/L.

Através de uma análise visual dos gráficos de resíduos verificou-se que não houve nenhuma violação à hipótese de linearidade, visto que os resíduos se dispersaram $\pm 5\%$, não existindo pontos atípicos influentes. Sempre que necessário, foram construídas curvas de calibração, analisados os resíduos da curva e o coeficiente de determinação como critérios para a aceitação das curvas de calibração.

Em seguida foi também realizado o teste de *Mandel* para demonstrar a adequabilidade da função de calibração a um modelo linear comparativamente a um ajuste polinomial. No Anexo 5 está apresentado um exemplo da folha de cálculo usada para a realização do teste de *Mandel* para o ácido cítrico, apresentando-se na Tabela 3.16 os valores obtidos para todos os ácidos com um intervalo de confiança de 99%.

Tabela 3.16 - Resultados do teste de *Mandel* para avaliação da linearidade das curvas de calibração dos ácidos orgânicos.

Ácidos	N	DS ²	PG	F (1, N-3, 99%)
Oxálico	9	3,41x10 ¹⁰	11,504	13,745
Tartárico	11	5,52x10 ¹¹	9,763	11,259
Lático	9	9,39x10 ⁹	1,032	13,745
Ascórbico	8	1,11x10 ¹²	10,858	16,258
Acético	10	6,55x10 ¹⁰	8,286	12,246
Cítrico	9	1,67x10 ¹¹	6,496	13,745
Málico	11	8,87x10 ¹¹	10,427	11,259
Propiónico	11	1,27x10 ¹¹	5,115	11,259

N - nº de concentrações dos padrões de calibração

Verifica-se que o valor de PG foi inferior ao valor F para todos os ácidos por isso se concluiu que existe um bom ajuste dos pontos, podendo ser utilizado um modelo de calibração linear.

Sensibilidade

A sensibilidade do método de determinação de ácidos orgânicos foi avaliada a partir da análise dos valores do declive das várias curvas de calibração obtidos por aplicação da equação 1.10. Determinou-se a média dos declives, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) e apresentam-se os valores de sensibilidade por ordem decrescente na Tabela 3.17.

A análise da tabela permite concluir que o método manteve sensibilidade constante ao longo dos vários ensaios realizados, apresentando coeficientes de variação menores de 5% para todos os analitos. É possível verificar ainda que o método com

maior sensibilidade é o relativo à análise do ácido ascórbico e o menos sensível para as determinações do ácido propiónico e acético.

Tabela 3.17 - Valores de sensibilidade, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) do método de determinação de ácidos orgânicos (UA - unidades de área).

Analito	Sensibilidade UA/(mg/L)	Desvio padrão (S) UA/(mg/L)	CV %
Ascórbico	35044,4	337,8	0,9
Oxálico	19011,6	335,8	1,8
Lático	12641,2	115,1	0,9
Málico	4245,0	85,0	2,0
Tartárico	3940,2	66,1	1,7
Cítrico	2530,3	45,4	1,8
Propiónico	1190,5	17,9	1,5
Acético	1178,0	27,7	2,4

Limites analíticos

Partindo do princípio de que as amostras de hortofrutícolas são matrizes que apresentam baixos teores de ácidos orgânicos, foram determinados de acordo com o descrito no subcapítulo 1.8.1 os limites analíticos de detecção (LD) e quantificação (LQ). Neste trabalho optou-se por definir estes limites pela aplicação das equações 1.11 e 1.12, respetivamente, cujos valores são apresentados na Tabela 3.18 em mg/L. Foram ainda calculados os limites do método por aplicação da equação 2.2 aos limites analíticos, considerando a massa de amostra (3 g) e o volume de extração (volume de solvente mais amostra, 23 mL) tendo-se obtido os valores apresentados na Tabela 3.18 em mg/100g.

Por análise da Tabela 3.18 verifica-se que os limites analíticos se encontram no intervalo de concentração entre os 5,9 e 161,4 mg/L para o limite de detecção e entre 17,8 e 489,1 mg/L para o limite de quantificação. E que os limites do método se encontram entre 4,5 a 123,7 mg/100g e 13,6 a 375,0 mg/100g, para o limite de detecção e quantificação do método, respectivamente.

Tabela 3.18 - Limites analíticos (mg/L) e do método de análise (mg/100g) dos ácidos orgânicos.

Analito	LD (mg/L)	LQ (mg/L)	LD (mg/100g)	LQ (mg/100g)
Oxálico	5,9	17,8	4,5	13,6
Tartárico	105,3	319,0	80,7	244,6
Lático	63,6	192,8	48,8	147,8
Ascórbico	30,1	91,1	23,1	69,9
Acético	161,4	489,1	123,7	375,0
Cítrico	123,0	372,6	94,3	285,6
Málico	125,1	379,2	95,9	290,7
Propiónico	92,2	279,3	70,7	214,1

Precisão

Os estudos de precisão foram realizados como descrito na Tabela 2.10; tendo-se avaliado a repetibilidade (precisão intra-ensaio) e a precisão intermédia (variabilidade intralaboratorial) com padrão misto contendo os oito ácidos orgânicos em estudo a duas gamas de concentração de modo a verificar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes.

Para determinar a **repetibilidade** do método, num conjunto de condições operatórias constantes, foram analisadas quatro tomas independentes, no mesmo dia e em condições de repetibilidade, ou seja, N=4 injeções de padrões mistos nas concentrações O4 e O6 apresentadas na Tabela 2.7. Encontra-se no Anexo 6 os dados e o formulário necessários à folha de cálculo. Para cada analito foram calculados os desvios-padrão relativos (S_{ri}) e os coeficientes de variação de repetibilidade (CV_r) através das equações 1.13 e 1.14, respetivamente, cujos resultados são apresentados nas Tabela 3.19 e Tabela 3.20.

Tabela 3.19 - Desvio padrão (S_{ri}) e coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) nas concentrações de O4.

	Oxálico	Tartárico	Lático	Ascórbico	Acético	Cítrico	Málico	Propiónico
S_{ri} (mg/100g)	1,2	2,0	5,1	5,9	7,0	8,7	4,0	5,2
CV_r (%)	3,8	0,3	0,7	0,8	1,1	1,3	0,6	0,8

Pela análise da Tabela 3.19 do estudo da repetibilidade para o nível de concentração mais baixa verifica-se que o ácido tartárico apresentou o menor coeficiente de variação de repetibilidade (0,3%) seguido dos ácidos málico e láctico, tendo os ácidos ascórbico e propiónico apresentado o mesmo CV_r (0,8%). Os ácidos oxálico, cítrico e acético apresentam os maiores valores de CV_r, mas inferiores a 5%. Ver a forma como foi dito nos açúcares.

Tabela 3.20 - Desvio padrão (S_{ri}) e coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) nas concentrações de O6.

	Oxálico	Tartárico	Láctico	Ascórbico	Acético	Cítrico	Málico	Propiónico
S_{ri} (mg/100g)	0,8	22,3	32,1	19,1	61,9	39,0	2,7	1,8
CV_r (%)	0,5	0,7	1,0	1,4	2,0	1,3	0,1	0,1

Na Tabela 3.20 relativa ao nível de concentração mais elevada pode observar-se que os ácidos málico, propiónico, oxálico e tartárico apresentaram o menor coeficiente de variação de repetibilidade seguidos de láctico, cítrico, ascórbico e acético sendo para todos os ácidos inferior a 5%.

Para determinar a **precisão intermédia** foram realizados ensaios da repetibilidade em três dias diferentes para cada amostra. A alteração desta condição experimental teve por objetivo concluir acerca da variabilidade dos resultados obtidos pelo mesmo método e no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, tendo-se analisado quatro tomas independentes do padrão misto dos ácidos orgânicos de concentração O4 e O6. Com a utilização das equações 3.15 e 3.16 calcularam-se o desvio padrão e o coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_R), respetivamente, cujos valores se apresentam nas Tabela 3.21 e Tabela 3.22 os quais foram determinados segundo a folha de cálculo que se encontra no Anexo 6.

Tabela 3.21 - Desvio padrão (S_{Ri}) e coeficiente de variação (CV_R) de precisão intermédia nas concentrações de O4.

	Oxálico	Tartárico	Láctico	Ascórbico	Acético	Cítrico	Málico	Propiónico
S_{Ri} (mg/100g)	3,1	202,7	40,5	25,8	82,7	67,3	43,1	42,9
CV_R (%)	6,2	7,9	3,8	3,2	9,3	6,1	4,2	4,5

Na Tabela 3.21, relativa ao nível de concentração mais baixa, verifica-se que os ácidos ascórbico e láctico apresentaram o menor coeficiente de variação de precisão

intermédia (3,2% e 3,8%) respetivamente, tendo todos os outros apresentado coeficientes de variação menores que 10%.

Tabela 3.22 - Desvio padrão (S_{Ri}) e coeficiente de variação (CV_R) de precisão intermédia nas concentrações O6.

	Oxálico	Tartárico	Lático	Ascórbico	Acético	Cítrico	Málico	Propiónico
S_{Ri} (mg/100g)	2,6	131,2	66,6	67,0	59,8	97,2	118,2	42,4
CV_R (%)	2,6	2,5	2,9	3,3	2,4	4,1	5,0	1,6

A Tabela 3.22, para o nível de concentração mais alta, mostra que o ácido propiónico apresentou o menor coeficiente de variação de repetibilidade (1,6%) seguido dos ácidos acético, tartárico, oxálico e lático, tendo os restantes ácidos apresentado coeficientes de variação menores ou iguais a 5%.

Globalmente os resultados obtidos da análise da precisão mostraram que o método foi preciso para os ácidos analisados, tendo-se atingido um coeficiente de variação máximo de 3,8% para a repetibilidade no ácido oxálico e de 9,3% para a precisão intermédia no ácido acético. O guia de controlo de qualidade interno do INIAV indica que o valor do coeficiente de variação nos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia deve ser inferior a 10% pelo que o método em validação cumpre o critério estabelecido.

Taxa de recuperação

Os ensaios das taxas de recuperação foram realizados de acordo com o procedimento experimental descrito na secção 2.5.4 estando as concentrações adicionadas às amostras descritas na Tabela 2.8. No Anexo 7 apresenta-se um exemplo para a laranja com os cálculos intermédios determinados por aplicação da equação 1.17. Os resultados apresentados na Tabela 3.23 correspondem à média dos resultados determinados para dois níveis de concentração para cada analito.

Verifica-se que as percentagens de recuperação obtidas se encontram, na generalidade, dentro dos valores aceitáveis. Os valores de taxa de recuperação obtidos variam para cada ácido consoante a matriz analisada.

Tabela 3.23 - Taxas de recuperação (%) dos ácidos orgânicos em diferentes matrizes.

Ácidos	Batata	Cenoura	Espinafre	Laranja	Maçã
Oxálico	88,7	88,7	97,2	94,6	102,4
Tartárico	95,1	85,9	106,3	84,0	93,4
Lático	96,5	83,5	97,8	80,8	85,9
Ascórbico	101,1	103,6	96,2	92,4	95,4
Acético	102,6	110,8	97,9	102,6	101,2
Cítrico	88,1	108,7	80,7	107,2	107,8
Málico	93,6	85,6	108,0	98,5	97,8
Propiónico	84,1	91,0	99,7	110,8	102,1

Globalmente os resultados obtidos da validação do método para a determinação dos ácidos orgânicos nas matrizes hortofrutícolas mostraram resultados satisfatórios para grande parte dos parâmetros validados.

3.3. Análise das amostras

Após a validação dos métodos analíticos, para a determinação dos açúcares e dos ácidos orgânicos, procedeu-se à análise das diversas amostras de hortofrutícolas conforme o objetivo deste estudo.

Foram analisadas 30 amostras de hortofrutícolas mencionadas na Tabela 2.5 de acordo com o procedimento experimental apresentado no subcapítulo 2.5.3 que descreve a técnica de extração e subcapítulo 2.5.5 que indica as condições cromatográficas definidas para a análise de quatro açúcares (sacarose, glucose, frutose e sorbitol) e oito ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, láctico, ascórbico, acético, cítrico, málico e propiónico).

Como já foi mencionado, a análise das várias amostras consistiu na obtenção de três extratos independentes e cada extrato foi injetado duas vezes no sistema cromatográfico. Os resultados obtidos através do *software* do sistema cromatográfico foram introduzidos numa folha de cálculo para determinar o teor de analito de que se apresenta exemplo para a cenoura (açúcares) e para a laranja (ácidos) no Anexo 7.

3.3.1. Análise dos perfis de açúcares e ácidos orgânicos dos hortofrutícolas

Apresentam-se na Figura 3.6 os cromatogramas sobrepostos relativos às três extrações independentes para o abacaxi, a título de exemplo, dos perfis cromatográficos obtidos que se encontram apresentados no Anexo 3.

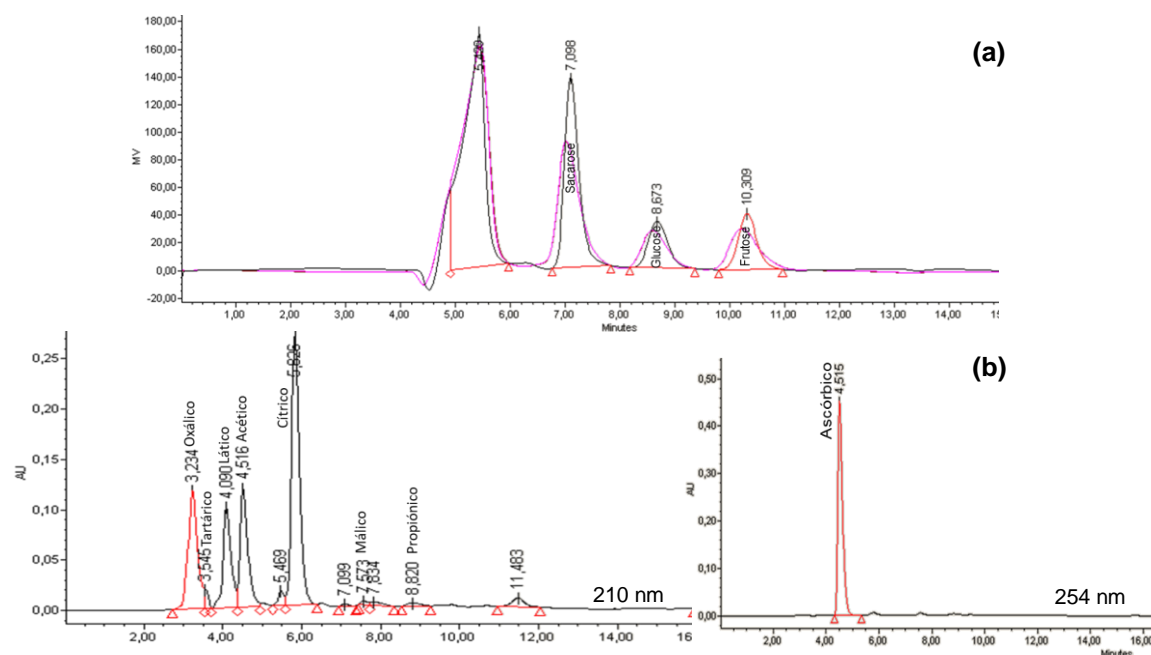


Figura 3.6 - Perfis cromatográficos do abacaxi. **(a)** Açúcares: sacarose ($tr=7,1$ min), glucose ($tr=8,7$ min) e frutose ($tr=10,3$ min); **(b)** Ácidos orgânicos: oxálico ($tr=3,2$ min), tartárico ($tr=3,5$ min), láctico ($tr=4,1$ min), ascórbico ($tr=4,3$ min), acético ($tr=4,5$ min), cítrico ($tr=5,8$ min), málico ($tr=7,6$ min) e propiónico ($tr=8,8$ min).

Pela análise do perfil de açúcares, Figura 3.6 (a), verifica-se que o açúcar presente em maior quantidade no abacaxi é a sacarose. Detetam-se ainda a glucose e frutose, como se pode observar pelos picos identificados no cromatograma, no entanto, os valores dos teores obtidos estão abaixo do limite de quantificação do método. Os álcoois de açúcar não foram identificados no abacaxi.

Relativamente ao perfil de ácidos orgânicos, Figura 3.6 (b), verifica-se que o ácido cítrico é predominante, seguido dos ácidos málico e oxálico também quantificados, no entanto, os ácidos tartárico, láctico, ascórbico, acético e propiónico apresentaram teores abaixo do limite de quantificação do método, porém, ainda detetáveis.

De modo a ter-se uma compreensão geral dos açúcares e ácidos orgânicos predominantes em cada matriz, bem como, dos analitos identificados, detetados e

quantificados, construiu-se a Tabela 3.24 recorrendo à análise dos cromatogramas do perfil de açúcares e ácidos orgânicos para as diferentes amostras (Anexo 3), bem como aos gráficos de colunas do perfil de analitos por grupo de hortofrutícolas (constantes do Anexo 8) através de comparações caso a caso. Nesta tabela o símbolo (+++) indica que foi possível quantificar o teor de analito na matriz; (++) que o analito apenas foi detetado, estando o valor obtido entre o limite de deteção e quantificação do método; (+) o teor determinado situou-se abaixo do limite de deteção e (-) para analitos que não foram identificados na matriz. De modo a facilitar a análise resume-se no final uma seção contendo o número total de picos por analito, relativamente ao total das amostras analisadas, quantificáveis, detetáveis, identificados e não identificados.

Tabela 3.24 - Análise dos perfis de analitos por grupos de hortofrutícolas.

Hortofrutícola	Açúcares					Ácidos orgânicos							
	Sac	Glu	Fru	Man	Sor	Oxa	Tar	Lat	Asc	Ace	Cit	Mal	Pro
Frutos hortícolas													
Beringela	-	+	+	-	-	+++	++	+++	-	++	++	++	++
Chuchu	-	+	+	-	-	+++	++	++	-	++	++	++	+++
Curgete	-	-	+	-	-	+++	+++	++	-	+++	++	++	++
Tomate	-	+	+	-	-	+++	++	++	-	+++	+++	++	++
Frutos pomóides													
Maçã	+++	+	++	-	+	+++	+++	++	-	++	++	+++	++
Pera	+	+	++	+	+	+++	+++	++	-	++	++	++	++
Frutos prunóides													
Alperce	+++	+	+	-	+	+++	++	+++	-	++	++	++	++
Ameixa am.	+++	++	+	-	+	+++	++	+++	-	++	++	+	++
Ameixa ve.	+++	+	++	-	+	+++	+++	++	-	++	++	++	+++
Cereja	+	+++	++	-	+	+++	+++	+++	-	+++	++	++	++
Nêspera	+	++	++	-	+	+++	++	+++	-	++	++	++	++
Pêssego	+++	+	+	-	+	+++	+++	++	-	++	+++	++	++
Frutos cítricos													
Laranja	+++	+	+	+	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++
Limão	+	+	+	-	-	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Frutos tropicais													
Abacaxi	+++	++	++	-	-	+++	++	++	++	++	+++	+++	++
Banana	++	++	++	+	-	+++	+++	+++	-	+++	++	+++	+++
Melancia	-	+	++	-	-	+++	+++	++	-	++	++	++	+++

Hortofrutícola	Açúcares					Ácidos orgânicos								
	Sac	Glu	Fru	Man	Sor	Oxa	Tar	Lat	Asc	Ace	Cit	Mal	Pro	
Raízes, bolbos e tubérculos														
Alho	+	-	+	-	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	
Batata	-	+	+	-	+	+++	++	+	-	++	+++	++	++	
Batata doce	+++	+	+	-	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	+++	
Beterraba	+++	-	-	+	-	+++	++	++	-	+++	+++	+++	++	
Cebola	+	+	+	-	-	+++	+++	++	-	++	++	++	++	
Cenoura	+++	+	+	-	-	+++	+++	++	-	++	++	+++	++	
Hortaliças folhosas														
Alface	-	-	+	+	-	+++	++	++	-	++	++	++	+++	
Brócolos	-	-	+	-	-	+++	+++	++	-	+++	+++	++	+++	
Couve	+	-	+	-	-	+++	+++	++	-	++	++	++	+++	
Espinafre	-	-	-	-	-	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	
Ervas aromáticas														
Coentros	+	-	+	-	-	+++	+++	++	-	+++	+++	++	+++	
Manjeriço	-	-	-	+	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	+++	
Salsa	-	-	+	+	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	
Total das matrizes														
Analito	Sac	Glu	Fru	Man	Sor	Oxa	Tar	Lat	Asc	Ace	Cit	Mal	Pro	
Quantificável	10	1	0	0	0	30	19	10	2	14	14	9	14	
Detetável	1	4	8	0	0		11	19	1	16	16	20	16	
Identificado	8	15	19	7	10			1	0			1		
Não Identificado	11	10	3	23	20				27					
Presença (%)	63	67	90	23	33	100	100	100	10	100	100	100	100	

Açúcares: Sac - sacarose, Glu - glucose, Fru - frutose, Man - manitol Sor - sorbitol; Ácidos orgânicos: Oxa - oxálico, Tar - tartárico, Lat - láctico, Asc - ascórbico, Ace - acético, Cit - cítrico, Mal - málico, Pro - propiónico; (+++) > LQ; (++) > LD < LQ; (+) < LD; (-) analito não identificado.

Analisando os perfis de açúcar verifica-se que das trinta amostras analisadas 50% apresentam simultaneamente os três açúcares principais (sacarose, glucose e frutose). De salientar que apenas numa amostra (espinafre) não se verificou a presença de nenhum dos açúcares em estudo.

Os resultados indicaram a presença de frutose em 90% das amostras, não se encontrando apenas em beterraba, espinafre e manjeriço.

De uma forma geral a sacarose, presente em 63% das amostras, foi quantificada nas amostras de frutos pomóides, prunóides, cítricos e tropicais, não tendo sido identificada na melancia. No grupo das raízes, bolbos e tubérculos, verificou-se que

a sacarose é o açúcar maioritário na batata doce, beterraba e cenoura, mas não foi identificado na batata.

Relativamente à glucose, presente em 67% das amostras, esta apenas foi quantificada na cereja mas foi possível detectá-la nos frutos prunóides e tropicais, não tendo sido identificada nas hortaliças folhosas e ervas aromáticas.

A identificação de manitol e sorbitol só foi possível em 23% e 33% das matrizes, tendo o cromatograma do extrato de pera apresentado o maior pico de sorbitol. Jovanovic-Malinovska *et al.* (2014) obteve 2,5 g/100g na pera, valor ligeiramente superior ao obtido neste trabalho (1,7g/100g). Relativamente ao manitol o maior pico foi obtido na amostra de alface. Verificou-se nos cromatogramas que os picos obtidos para os álcoois de açúcar correspondem a sinais muito fracos pelo que, em trabalhos futuros, será de efetuar a adição de padrão dos analitos às amostras duvidosas para verificar a sua influência nos respetivos picos.

A sacarose e glucose foram os únicos açúcares quantificados e, como esperado, verificou-se que a decisão de não usar uma gama de trabalho com início em concentrações mais baixas comprometeu a quantificação dos açúcares, em especial na análise dos hortícolas e na análise de frutose que se verificou ser o açúcar mais presente nos hortofrutícolas.

Analisando os perfis de ácidos orgânicos verifica-se que as trinta amostras analisadas apresentam todos os ácidos com exceção do ascórbico que só está presente em 10% das amostras, provavelmente devido a instabilidade da molécula; tendo-se quantificado pelo menos três ácidos orgânicos por amostra em 70% dos hortofrutícolas.

3.3.2. Análise dos teores de analitos obtidos nos hortofrutícolas

3.3.2.1. Açúcares

Da Figura 3.7 à Figura 3.9 apresentam-se em gráficos de colunas, os valores médios dos teores obtidos por açúcar, em g/100g, com barras de erro padrão (SE) da média de três extrações independentes, o qual foi determinado de acordo com a equação 3.1:

$$SE = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (3.1)$$

Onde: S - é o desvio padrão e n - é o número de extrações independentes, ou seja, três.

Os hortofrutícolas encontram-se agrupados nos gráficos de acordo com a Tabela 2.5, não se apresentando resultados abaixo do limite de detecção. Os valores entre parêntesis correspondem a valores que se encontram entre o limite de detecção e quantificação do método e não foram utilizados na ANOVA, os índices de letras iguais significam que não há diferenças significativas para $p < 0,05$, $n=3$ (teste Scheffé).

Para melhor compreensão das relações entre analitos por grupos de hortofrutícolas apresenta-se ainda, no Anexo 8, gráficos com os teores obtidos dos analitos para as matrizes por grupo de hortofrutícolas.

Sacarose

Apresenta-se o teor de sacarose por hortofrutícola, na Figura 3.7, cuja quantificação varia de 1,82 a 8,78 g/100g. Verifica-se que há diferenças significativas do teor de sacarose para amostras dentro do mesmo grupo e semelhanças entre amostras de grupos diferentes o que compromete a análise comparativa entre e dentro dos grupos. Pela aplicação da ANOVA com teste *Scheffé* ($p < 0,05$) as ameixas (amarela e vermelha) e maçã apresentaram semelhanças entre si (grupo de prunóides e pomóides), apresentando os teores mais baixos de sacarose. Esta aplicação mostrou ainda que abacaxi, alperce e batata doce possuem um teor de sacarose semelhante, o mesmo acontecendo com a cenoura e a laranja. No entanto, todas as

amostras do grupo das raízes, bolbos e tubérculos apresentam diferenças significativas com 95% de probabilidade.

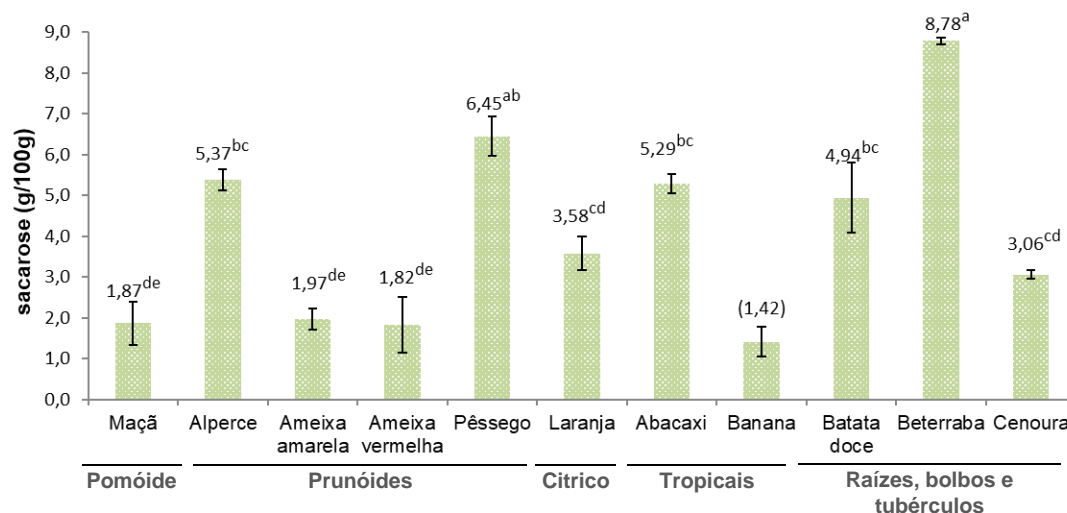


Figura 3.7 - Teores de sacarose por hortofrutícola analisado.

Analisando os teores de sacarose os resultados indicaram que a beterraba e o pêssego apresentam o maior teor de sacarose, por isso possuem elevado potencial energético para a produção do biocombustível, com teores de sacarose disponíveis na biomassa superiores aos dos outros frutos analisados. Entretanto, devido á elevada quantidade de resíduos do processamento de laranja gerados pelas indústrias portuguesas estes também apresentam potencial energético relevante.

Comparando os teores de sacarose determinados neste trabalho nos frutos, com os valores obtidos por outros autores (Tabela 1.2), beterraba (6,64 g/100g, Lee *et al.* 1970); pêssego (6,20 g/100g, Pérez *et al.*, 1997); alperce (5,82 g/100g, Lee *et al.* 1970) e abacaxi (3,71 g/100g, Leonel *et al.*, 2014) é possível considerar que os valores obtidos neste trabalho estão dentro da mesma ordem de grandeza. Jovanovic-Malinovska *et al.* (2014) também determinou este açúcar em amostras de maçã (5,73 g/100g), pêssego (5,36 g/100g), ameixa (1,11 g/100g) e cenoura (4,12 g/100g). No entanto, este autor analisou apenas as partes comestíveis dos hortofrutícolas e as amostras neste trabalho foram analisadas com cascas, polpas e sementes, o que poderá justificar a diferença dos resultados. Além disso, há ainda a ter em conta as variações de teor devido a diferentes variedades, ao grau de maturação, condições edafoclimáticas, tempo de prateleira, etc. (Jovanovic-Malinovska *et al.* 2014).

Glucose

Relativamente ao teor de glucose e conforme se observa no gráfico apresentado na Figura 3.8, a cereja foi o único hortofrutícola possível de quantificar este analito. Jovanovic-Malinovska *et al.* (2014) reportam para a cereja o teor de glucose (4,63 g/100g) muito semelhante ao valor determinado neste trabalho (4,14 g/100g).

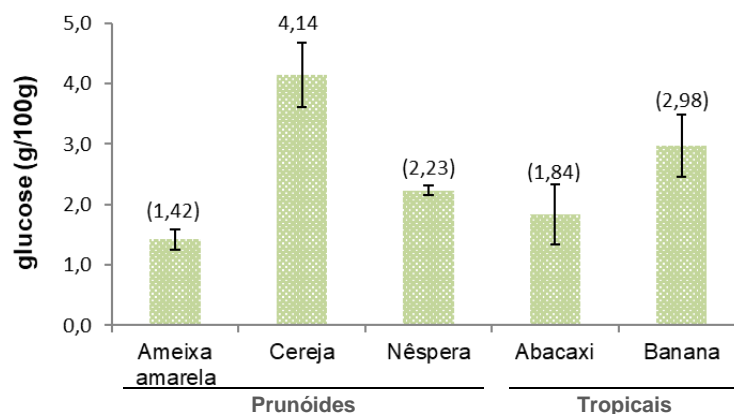


Figura 3.8 - Teores de glucose por hortofrutícola.

Nas outras matrizes que constam do gráfico foi detetada a presença da glucose, mas em teor inferior ao limite de quantificação do método. Na literatura reportam-se teores de glucose em frutos, verificando-se valores próximos dos detetados neste trabalho para a banana (Tabela 1.2); nêspera (3,22 g/100g em Jovanovic-Malinovska *et al.* 2014); abacaxi (2,26 g/100g em Leonel *et al.*, 2014) e ameixa (5,53 g/100g em Jovanovic-Malinovska *et al.* 2014).

Frutose

Quanto à análise da frutose, apresentam-se na Figura 3.9 os teores obtidos para as matrizes em que este analito foi detetado. Nestas amostras foram determinados teores inferiores ao limite de quantificação do método, fato que ocorre devido às baixas concentrações de frutose em muitos hortícolas, levando à necessidade de ajustar a gama de trabalho a fim de se obter mais valores quantificáveis, pois a frutose é o açúcar mais presente (90%) nas matrizes hortofrutícolas em estudo.

A análise da Figura 3.9 e dos perfis no Anexo 3, demonstram ser os pomóides, maçã e pera, os que apresentam maiores teores de frutose, seguidos da cereja. Podemos verificar na Tabela 1.2 que outros autores, reportam teores para maçã (2,3

g/100g) e pera (4,5 g/100g) ligeiramente inferiores aos obtidos neste trabalho. Jovanovic-Malinovska *et al.* (2014) refere para a cereja, um teor de frutose de 2,32 g/100g e indica a pera como o fruto com maior teor deste analito. O teor máximo de frutose neste trabalho é obtido na pera e maçã (5,44 g/100g).

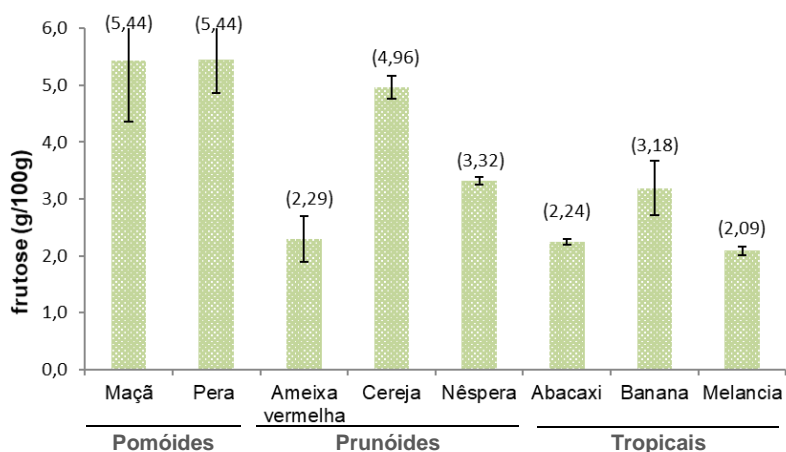


Figura 3.9 - Teores de frutose por hortofrutícola.

Pela análise dos perfis de açúcares nos hortofrutícolas, com exceção de alguns frutos que apresentaram sacarose e glucose com valores quantificáveis na gama de concentrações escolhida, verificou-se que não foram quantificados açúcares nos hortícolas, mais uma vez mostrando a necessidade da calibração numa gama de concentrações mais baixa para todos os açúcares, trabalho que estava planeado para a gama de 0,1 a 5,0 g/L (Sequeira, 2012, usou a gama de 0,3 a 5 g/L). No entanto, este trabalho iria comprometer a análise de ácidos orgânicos, tendo-se optado por não o realizar.

3.3.2.2. Ácidos orgânicos

Da Figura 3.10 à Figura 3.17 apresentam-se gráficos de colunas dos teores de ácidos orgânicos (média de três extrações independentes) em mg/100g, com barras de erro padrão (equação 3.1) por hortofrutícola e distribuídos em grupos. Tal como para os açúcares índices com letras iguais significa que não há diferenças significativas para $p < 0,05$, $n=3$ (teste de Scheffé) obtidas por aplicação da ANOVA *one-way* aos resultados quantificados. Os resultados entre parêntesis são inferiores ao limite de quantificação do método, não sendo apresentados valores abaixo do limite de deteção.

Ácido oxálico

Pela análise da Figura 3.10, onde se apresentam teores de ácido oxálico, verifica-se que o teor de ácido oxálico foi quantificado em todas as amostras e apresenta-se num intervalo de 33 a 1863 mg/100g. Verifica-se que existem diferenças significativas para amostras do mesmo grupo e semelhanças entre amostras de grupos diferentes, manjeriço e coentros apresentam o maior teor de ácido oxálico. Os valores obtidos, refletem uma tendência de maiores teores nos grupos das hortaliças folhosas e das ervas aromáticas do que nos outros grupos.

No gráfico é possível destacar a banana como o fruto que apresenta o maior teor de ácido oxálico (890 mg/100g).

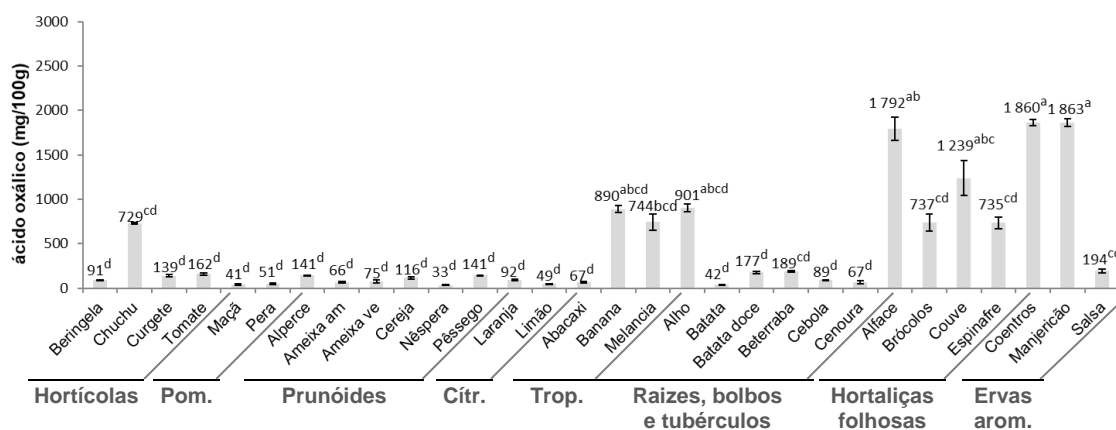


Figura 3.10 - Teores de ácido oxálico por hortofrutícola.

Os teores de ácido oxálico em todos os hortofrutícolas analisados, são superiores aos encontrados na literatura (Tabela 1.4), exceto para a maçã com teor próximo de 30 mg/100g como referido por Hönnow e Hesse (2002). Os valores superiores podem ser explicados pela forma como foi realizada a amostragem (juntando cascas, sementes, talos e polpa), tendo em conta que Walker e Famiani (2018) verificaram no kiwi que os teores obtidos para este ácido são muito maiores na pele e sementes do que na polpa, devido ao conteúdo de oxalato insolúvel. No espinafre, o ácido oxálico atua como um antinutriente por formar com o ferro, oxalato insolúvel, tornando 95% deste não utilizável pelo organismo, em outros vegetais, por exemplo nos brócolos, o ácido oxálico pode combinar-se com o cálcio, formando oxalato de cálcio que é insolúvel, podendo provocar pedras nos rins e na bexiga (Nguyễn e Savage, 2013).

Ácido tartárico

Pode analisar-se na Figura 3.11 o teor de ácido tartárico, com valores no intervalo de 244 a 2787 mg/100g. Verifica-se que o ácido tartárico foi quantificado em todos os grupos sem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras com exceção do alho, onde se verifica o maior teor obtido, justificando o seu sabor forte e amargo tendo em conta as características deste ácido.

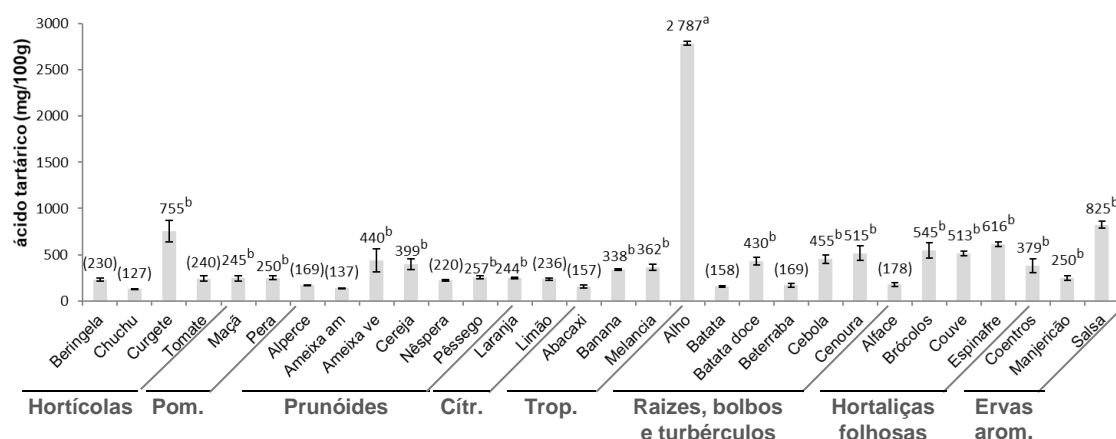


Figura 3.11 - Teores de ácido tartárico por hortofrutícola.

Entre os frutos analisados, a ameixa vermelha destaca-se por apresentar o maior teor (440 mg/100g). Walker e Famiani (2018) obtiveram valores inferiores para ameixa (4 mg/100g); o mesmo ocorre nos citrinos (38 mg/100g) e na cereja (8 mg/100g) e Chen *et al.* (2007) que realizou um estudo em oito cultivares de pera e obteve valores de 1,0 a 7,1 mg/100g.

Ácido láctico

Pela análise da Figura 3.12 com o teor de ácido láctico nas amostras, que foi quantificado num intervalo de 151 a 245 mg/100g, verifica-se que o alho apresenta o maior teor, seguido de outras hortofrutícolas pertencentes a diferentes grupos e sem diferenças significativas entre eles ($p < 0,05$).

Através de uma observação global dos resultados obtidos verifica-se que o ácido láctico é o ácido presente em menores quantidades nas matrizes analisadas, contribuindo apenas com 5% para a acidez total dos hortofrutícolas, como se pode observar na Figura 3.19, onde se apresenta a contribuição média obtida de cada ácido orgânico para a acidez total.

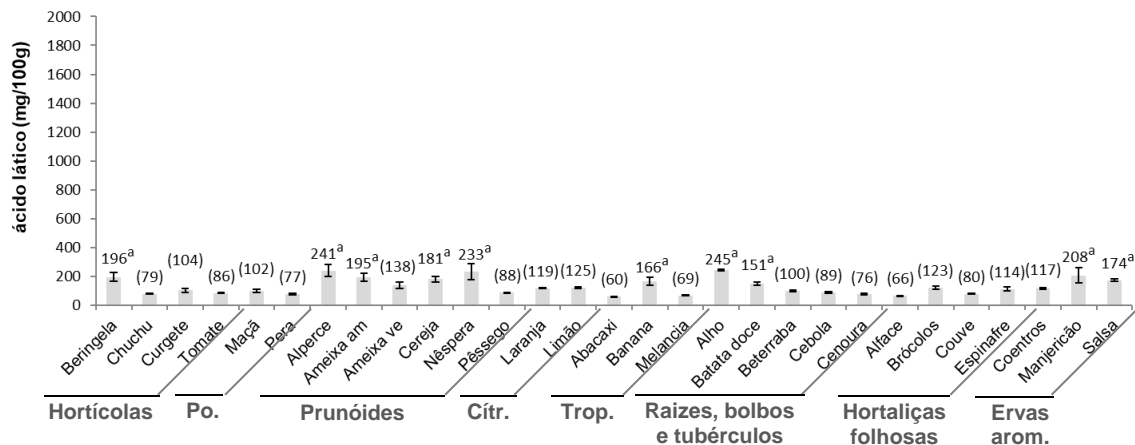


Figura 3.12 - Teores de ácido láctico por hortofrutícola.

Ácido acético

Pela análise da Figura 3.13 verifica-se que os teores de ácido acético não apresentam diferenças significativas entre os vários grupos ou hortofrutícolas e os teores quantificados estão num intervalo de 384 a 804 mg/100g, numa sequência decrescente de alho para beringela. Este ácido contribui com menos de 15% para a acidez total (Figura 3.19).

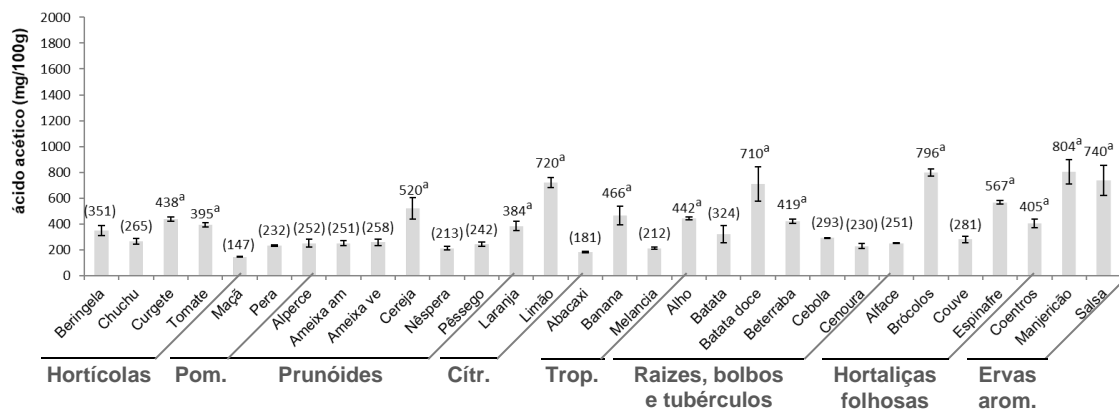


Figura 3.13 - Teores de ácido acético por hortofrutícola.

Ácido cítrico

Na análise do teor de ácido cítrico nos vários hortofrutícolas, apresentada na Figura 3.14, verifica-se que existem diferenças significativas para amostras do mesmo grupo e semelhanças entre amostras de grupos diferentes ($p < 0,05$) e o teor de ácido cítrico quantificado no intervalo de 268 a 1708 mg/100g.

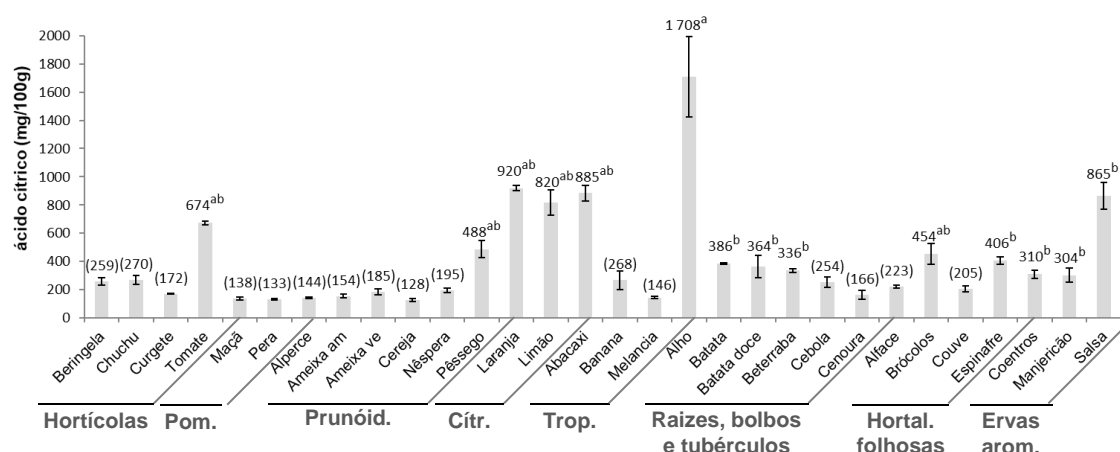


Figura 3.14 - Teores de ácido cítrico por hortofrutícola.

O ácido cítrico é o ácido mais relevante nos hortofrutícolas analisados (Figura 3.19) apresentando a maior percentagem de contribuição média para a acidez total (19%), sendo ainda o que mais contribui para o sabor ácido nos citrinos (37%, Figura 3.20) o que está de acordo com o trabalho de Zheng *et al.*, 2016. Outros autores, apresentam teores comparáveis aos obtidos neste trabalho, tendo em conta as diferenças nas variedades e amostragem, 980 mg/100g para laranja (Walker e Famiani, 2018) e 560 mg/100g para abacaxi (Leonel *et al.*, 2014).

Pode observar-se no Anexo 8, onde constam os gráficos de colunas do perfil de analitos por grupo de hortofrutícolas, que na Figura A8.4 a laranja apresenta o maior teor de ácido cítrico, enquanto que nos frutos o limão apresenta o maior teor de ácido málico. Segundo Leonel *et al.* (2014) o ácido cítrico é o principal ácido no abacaxi, o que também se verifica neste trabalho (Anexo 8, Figura A8.5) seguido pelos ácidos málico e ascórbico.

Ácido málico

Pela análise da Figura 3.15 verifica-se que o teor de ácido málico quantificado nos hortofrutícolas se encontra no intervalo de 336 a 1158 mg/100g, apresentando o maior valor para o alho e salsa, seguido de outros hortofrutícolas pertencentes a diferentes grupos mas sem diferenças significativas entre eles ($p < 0,05$).

Este ácido encontra-se normalmente em frutos pomoides e cítricos, tendo-se quantificado 360 mg/100g para a maçã e detetado 160 mg/100g para a laranja, valores que se podem comparar com os obtidos por Ehling e Cole (2011) para a

maçã (380 mg/100g) e para laranja (195 mg/100g), tendo em conta as variações de teores entre variedades diferentes.

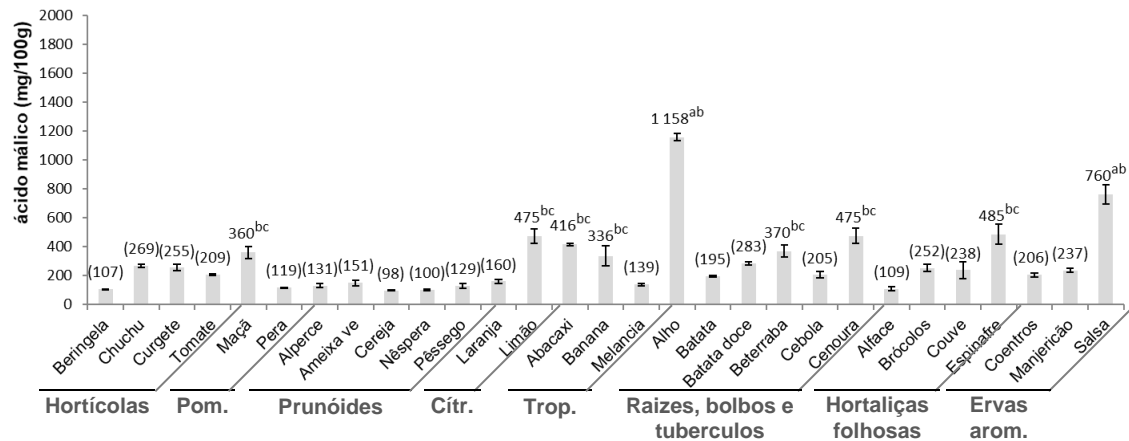


Figura 3.15 - Teores de ácido málico por hortofrutícola

Os ácidos orgânicos são muito suscetíveis às condições edafoclimáticas e ao grau de maturação dos frutos (Scherer *et al.*, 2012 e Andrés *et al.*, 2015), além disso, o maior conteúdo de ácido málico e cítrico encontra-se nas partes comestíveis (Walker e Famiani, 2018).

Ácido propiônico

Pela análise da Figura 3.16 verifica-se o teor de ácido propiônico quantificado num intervalo de 217 a 1431 mg/100g e numa sequência decrescente do alho para espinafre e as amostras com menores teores quantificados não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Visto que a formação do ácido propiônico se processa normalmente durante a degradação oxidativa e dada a volatilidade deste composto, os hortofrutícolas que o contêm apresentam cheiro característico (Camargo *et al.*, 2001) como é o caso do alho.

Este ácido contribui muito para o aroma mas é muito instável podendo ser facilmente perdido e por isso apresentar grandes variações de valores obtidos. Pode observar-se na Figura 3.19 que o ácido propiônico contribui apenas com 8% para a acidez total dos hortofrutícolas.

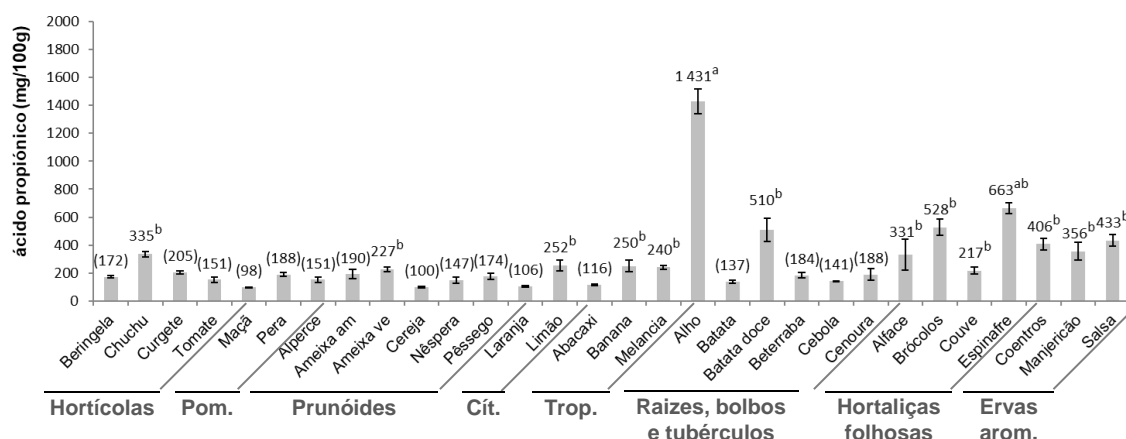


Figura 3.16 - Teores de ácido propiónico por hortofrutícola.

Ácido ascórbico

Relativamente aos teores de ácido ascórbico nos hortofrutícolas apresentados na Figura 3.17, podemos verificar que apenas em três frutos (laranja, limão e abacaxi) foi possível detetar ou quantificar o teor de ácido ascórbico.

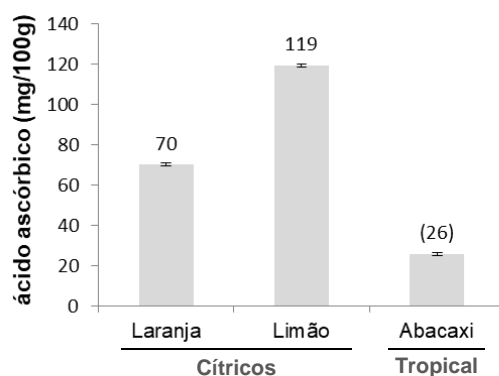


Figura 3.17 - Teores de ácido ascórbico por hortofrutícola.

Os frutos cítricos são ricos em ácido ascórbico (vitamina C) e por esta razão possuem elevada ação antioxidante. Walker e Famiani (2018) apresentam teor de ácido ascórbico para laranja de 75 mg/100g e para limão de 50 mg/100g. Outros autores (Leonel *et al.*, 2014) estudaram abacaxi tendo obtido 23,5 mg/100g de teor em ácido ascórbico. Apesar do método não ter em conta a sensibilidade à luz do ácido ascórbico nem a interferência do ácido dihidroascórbico na determinação de vitamina C, os teores obtidos neste trabalho encontram-se dentro do intervalo dos teores observados na bibliografia, com exceção do limão que apresenta um teor

superior mas justificável pelas diferenças das variedades e devido ao tipo de amostragem efetuada.

Na análise de açúcares e ácidos orgânicos nos hortofrutícolas os erros padrão estão associados principalmente ao tipo de amostragem definida e à complexidade das matrizes das amostras. Neste trabalho a amostragem de cada hortofrutícola inclui casca, polpa, talos e sementes que se podem encontrar em diferentes proporções nas amostras. Este facto, originou diferenças nos teores de açúcares e de ácidos orgânicos determinados nos extratos pois existem diferentes teores dos analitos nos frutos quando analisados com e sem casca, como demonstrado por Muir *et al.* (2009), existem também, diferentes teores nas sementes, polpa e talos.

Ácidos orgânicos totais

Na Figura 3.18 apresentam-se os teores de ácidos orgânicos totais presentes nas amostras de hortofrutícolas num intervalo de 1,1 a 8,7 g/100g.

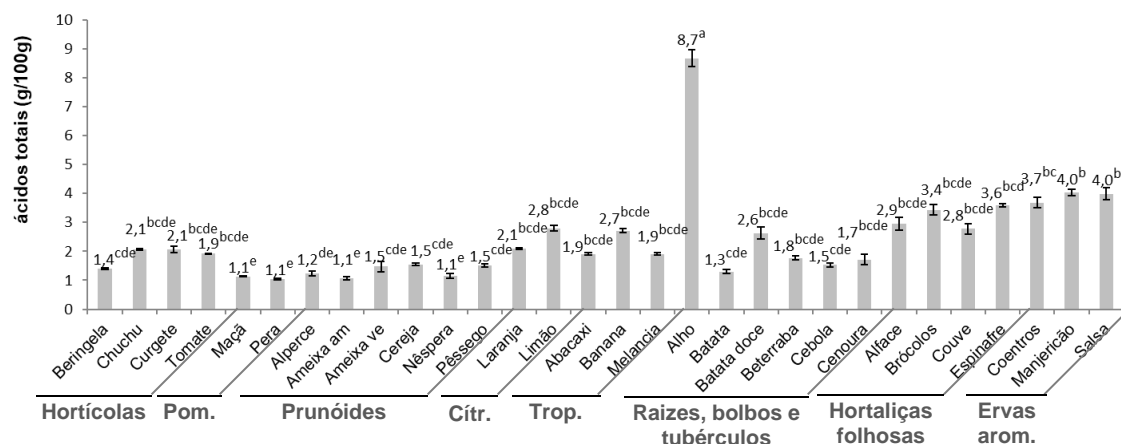


Figura 3.18 - Teores de acidez total (soma dos teores quantificáveis de ácidos individuais).

Através da análise dos teores de ácidos totais obtidos nas diferentes amostras analisadas, conclui-se que o alho (8,7 g/100g) e as ervas aromáticas manjeriço e salsa (4,0 g/100g) apresentaram os maiores teores de acidez total, verifica-se ainda que existem diferenças significativas para amostras do mesmo grupo e semelhanças entre amostras de grupos diferentes ($p < 0,05$).

Tendo em conta que a acidez é um indicativo do sabor ácido ou azedo nos hortofrutícolas e esta é representada pela concentração total de ácidos orgânicos presentes, seria de se concluir que dentre todas as amostras analisadas, o alho

possui sabor mais ácido devido a apresentar a maior quantidade de ácidos orgânicos e pouco ou nenhum conteúdo de açúcar, o mesmo ocorre para as ervas aromáticas, essa característica pode ser facilmente percebida sensorialmente quando comparando o seu sabor com o de outros hortofrutícolas analisados, pois possuem sabor mais adstringente ou azedo. Verificou-se, com algumas exceções, que os frutos apresentam menor acidez e os hortícolas maior acidez.

De modo a verificar a contribuição média de cada um dos analitos nos ácidos totais, calculou-se a percentagem de contribuição para a acidez total, pela razão entre o teor de analito e o teor total de ácidos em cada matriz e realizou-se a média dessas razões por grupo de hortofrutícolas e em seguida a média total para cada analito, valores que se apresentam nas Figuras 3.19.

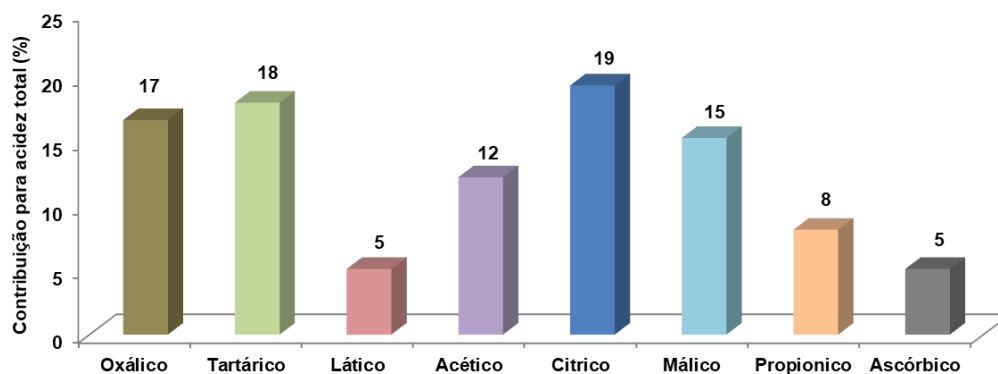


Figura 3.19 - Contribuição média de cada ácido para a acidez total nos trinta hortofrutícolas.

Pela análise da Figura 3.19, pode afirmar-se que o ácido cítrico, com 19% de contribuição média para a acidez total nos hortofrutícolas, é o principal ácido nas matrizes analisadas, seguido dos ácidos tartárico (18%), oxálico (17%) e málico (15%), considerando pouco relevantes os ácidos que contribuem com menos de 15% para o teor de ácidos orgânicos totais.

Apresentam-se nas Figuras 3.20 e 3.21 a percentagem de contribuição média de cada analito para a acidez total por grupos de hortofrutícolas.

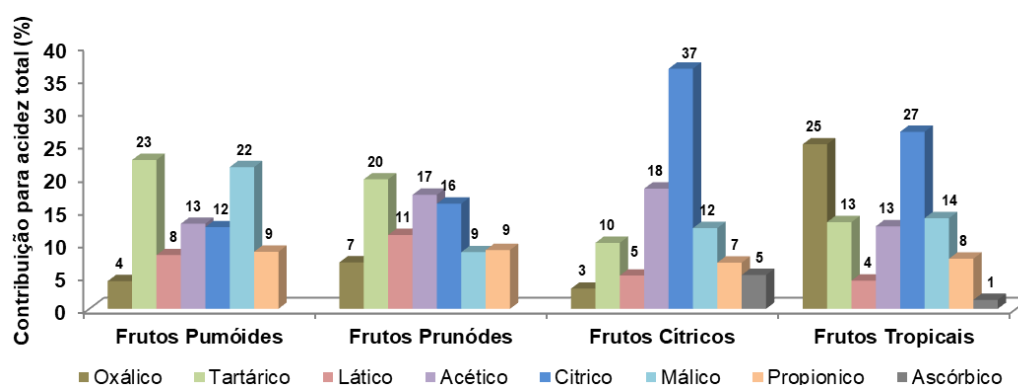


Figura 3.20 - Contribuição média de cada ácido para a acidez total nos frutos não hortícolas.

Pode observar-se pela análise da Figura 3.20, que os frutos pomóides têm a sua acidez bastante influenciada pelos ácidos málico (22%), tartárico (23%) e cítrico (12%). O ácido málico possui maior poder acidulante que o tartárico sendo possível que nas amostras em que estes ácidos estão presentes conjuntamente, o ácido málico contribuía mais fortemente para o sabor ácido mesmo que o ácido tartárico se apresente em maior teor, tal como acontece com o ácido cítrico devido a ter o maior poder acidulante.

O ácido cítrico é o ácido que mais contribui para o sabor ácido nos citrinos e nos frutos tropicais e em ambos os grupos se verificou a presença de ácido ascórbico, com se pode observar na Figura 3.20.

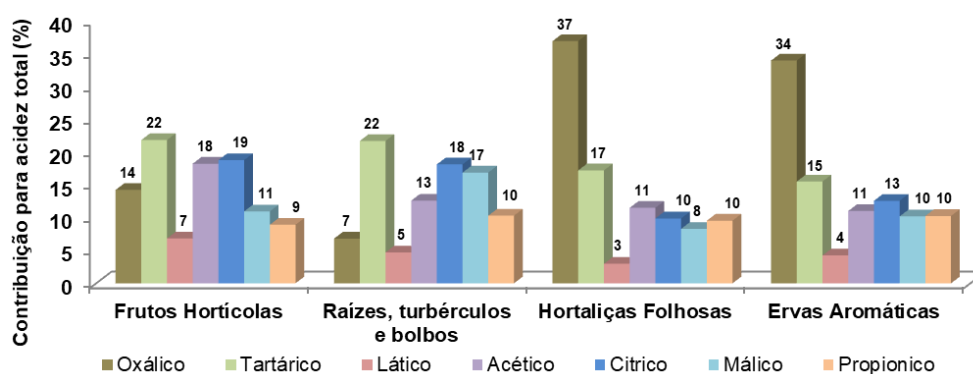


Figura 3.21 - Contribuição média de cada ácido para a acidez total nos grupos de hortícolas.

Pela análise da Figura 3.21, os grupos das hortaliças folhosas e ervas aromáticas possuem acidez influenciada pelos ácidos oxálico e tartárico. Verifica-se também, que o ácido oxálico está presente maioritariamente nas folhas (grupos das hortaliças folhosas e ervas aromáticas).

No grupo dos frutos prunóides (Figura 3.20), frutos hortícolas (Figura 3.21) e no grupo das raízes, bolbos e tubérculos (Figura 3.21) verifica-se uma grande variabilidade no perfil de ácidos orgânicos não sendo possível identificar globalmente quais os ácidos que mais afetam a acidez destes hortofrutícolas, como se pode observar nas respetivas Figuras 3.20 e 3.21.

O ácido tartárico apresenta uma grande influência na acidez do grupo das raízes tubérculos e bolbos (Figura 3.21), maioritariamente devido ao seu elevado teor no alho (Anexo 8, Figura A8.6), o que explica seu sabor forte e amargo, visto que este ácido confere essa característica aos produtos em que está presente.

Apresenta-se no Anexo 9 uma tabela resumo da quantidade de analitos (açúcares e ácidos orgânicos) quantificados por grupos para as trinta amostras, bem como, o valor mínimo e máximo de cada analito por grupo e no total das trinta amostras.

Nos hortofrutícolas a proporção açúcar/ácido é responsável pelo sabor e aroma, sendo assim, é possível que frutos com sabor doce não tenham necessariamente um elevado teor de açúcar, mas contenham níveis baixos de ácidos orgânicos, especialmente dos ácidos cítrico e málico, por possuírem maior poder acidulante. Esta proporção influencia a percepção da doçura e Mikulic-Petkovsek et al. (2012) constatou no morango que o teor combinado de açúcar e ácido mostrou ter um maior efeito no sabor da fruta. Neste trabalho verifica-se, de forma geral, que os frutos não hortícolas possuem os maiores teores de açúcar e menores teores de ácidos.

A concentração dos ácidos orgânicos varia de acordo com a espécie de hortofrutícola, o solo, a época da colheita, o tempo de prateleira, condições edafoclimáticas, entre outros. Os trabalhos realizados por Shaw e Wilson (1981), permitem concluir que as proporções dos analitos podem variar muito nos diferentes estágios de maturação, pois frutos em estágio mais avançado de maturação apresentam maior teor de açúcares e menor teor de ácidos (Leonel et al., 2014). Fatores que podem justificar as diferenças nos resultados obtidos quando comparados com a literatura.

A amostragem definida incluindo cascas, polpa, sementes e talos, deveria ter sido previamente homogeneizada pois os teores de ácidos orgânicos variam muito em cada uma dessas partes e a não realização desse procedimento prévio justifica as

variações nos resultados obtidos, o que pode ser observado nos picos dos cromatogramas com as injeções das três extrações independentes no Anexo 3 e nos valores de erro padrão obtidos (barras de erro nos gráficos das Figuras 3.7 a 3.18 e 3.22).

Capítulo 4

CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO

4.1. Conclusões

Os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência usados neste trabalho revelaram ser adequados para a identificação (sacarose, glucose, frutose, manitol e sorbitol) e quantificação (sacarose e glucose) de açúcares; e identificação e quantificação (oxálico, tartárico, láctico, ascórbico, acético, cítrico, málico e propiónico) de ácidos orgânicos em trinta matrizes de hortofrutícolas analisadas nos dois métodos em corridas de 16 minutos cada.

Os açúcares foram extraídos em água morna, usando soluções *Carrez* para clarificação e os ácidos orgânicos extraídos com tampão fosfato (KH_2PO_4 0,05 M, pH 2,8), tendo os métodos de extração selecionados mostrado-se eficientes para a determinação dos analitos.

Os métodos apresentaram linearidade adequada com coeficientes de correlação maiores de 0,995 e por aplicação do teste de *Mandel* para todos os analitos na gama de concentrações de 1,0 a 30 g/L e 0,01 a 4,0 g/L para açúcares e ácidos orgânicos, respetivamente, a qual foi validada através do teste da homogeneidade das variâncias.

Os métodos mostraram-se sensíveis em toda a gama de aplicação ao longo do tempo, obtendo-se coeficientes de variação de sensibilidade menores que 5%.

Os limites de deteção e quantificação variaram de 0,2 a 0,6 g/L e de 0,5 a 1,9 g/L (para os açúcares) e de 5,9 a 161,4 mg/L e de 17,8 a 489,1 mg/L (para os ácidos). Os limites de deteção e quantificação do método variaram de 0,6 a 2,1 g/100g e de 1,7 a 6,4 g/100g (para os açúcares) e de 4,5 a 123,7 mg/100g e de 13,6 a 375,0 mg/100g (para os ácidos), respetivamente.

Relativamente á precisão do método, esta foi avaliada através de ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia que revelaram valores de coeficientes de variação, inferiores a 10%, repetibilidade com $\text{CVR} \leq 4,5\%$, para os açúcares; $\text{CVR} \leq 3,8\%$, para os ácidos, e precisão intermédia com $\text{CVR} \leq 5,3\%$, para os açúcares; $\text{CVR} \leq 9,3\%$, para os ácidos.

Foram determinadas taxas de recuperação para cinco hortofrutícolas (batata, cenoura, espinafre, laranja e maçã) cujos valores variaram para os açúcares entre

78% a 110% e para os ácidos orgânicos entre 81% a 111%, resultados que estão dentro dos valores aceitáveis pelo INIAV.

Na pesquisa bibliográfica foram identificados estudos que aplicaram métodos semelhantes aos usados neste trabalho para a quantificação tanto de açúcares quanto de ácidos orgânicos em sumos de fruta e em produtos hortofrutícolas em fresco, onde foram obtidos teores para os açúcares dentro da gama de concentrações obtida neste trabalho. No entanto, para os ácidos orgânicos os teores obtidos apresentam variações em relação aos mencionados na literatura, que podem ser devidas às diferentes variedades/cultivares analisadas e aos diferentes graus de maturação das matrizes, bem como ao tipo de amostragem efectuada, com cascas, sementes, talos e polpa.

Os métodos analíticos desenvolvidos determinam maior número de analitos (ácidos orgânicos) em menor tempo (açúcares e ácidos orgânicos) do que os métodos descritos na literatura.

Entre os açúcares estudados, a sacarose é o que mais contribui para o teor em açúcares totais. A sacarose esteve presente em 63% das amostras e foi quantificada em 33% das amostras pertencentes a cinco grupos, os dos frutos (pomóides, prunóides, cítricos e tropicais) e o grupo das raízes, bolbos e tubérculos, apresentando teores num intervalo de 1,82 a 8,78 g/100g. A glucose esteve presente em 67% das amostras e foi quantificada no grupo dos frutos prunóides (4,14 g/100g cereja). A frutose esteve presente na maioria das amostras (90%) e devido ao seu elevado poder edulcorante deve ter-se em conta a sua elevada contribuição na doçura dos frutos. O sorbitol esteve presente em 33% das amostras, maioritariamente em frutos pomóides e prunóides e o manitol em 23% das amostras com destaque no grupo das ervas aromáticas.

A beterraba e pêssigo com teores de sacarose disponíveis na biomassa superiores aos dos outros frutos analisados sugerem que os seus resíduos possuem elevado potencial energético para a produção de biocombustível. Entretanto, devido à elevada quantidade de resíduos gerados do processamento de laranja, pelas indústrias portuguesas e ao teor de sacarose que contém, estes também apresentam potencial bioenergético relevante.

Entre os ácidos orgânicos estudados, o ácido cítrico é o que mais contribui, com 19%, para o teor total de ácidos orgânicos nos hortofrutícolas, seguido do ácido tartárico (18%), oxálico (17%) e málico (15%). No entanto, como os ácidos cítrico e málico possuem maior poder acidulante que o tartárico é possível concluir que nos grupos em que estes ácidos estão presentes conjuntamente, os ácidos cítrico e málico contribuem fortemente para o sabor ácido mesmo que o ácido tartárico se apresente em maior teor, como é o caso do málico no grupo dos frutos pomóides e do cítrico no grupo dos frutos cítricos. Pode também observar-se que todos os ácidos, excecção o ascórbico, estiveram presentes em todos os grupos.

O ácido oxálico foi quantificado em todos os hortofrutícolas apresentando teores num intervalo de 33 a 1863 mg/100g. O ácido tartárico foi quantificado em todos os grupos num intervalo de 244 a 2787 mg/100g. Os ácidos cítrico, o acético e o propiónico não foram quantificados nos frutos pomóides, tendo apresentado teores no intervalo de 304 a 1708 mg/100g, de 384 a 804 mg/100g e de 217 a 1431 mg/100g, respetivamente. O ácido láctico não foi quantificado nos hortícolas, frutos pomóides e cítricos, nem nas hortaliças folhosas, tendo sido quantificado no intervalo de 151 a 245 mg/100g. O ácido málico foi quantificado no grupo dos frutos (pomóides, cítricos e tropicais) e no grupo das raízes, bolbos e tubérculos bem como no das hortaliças folhosas e ervas aromáticas apresentando teores num intervalo de 336 a 1158 mg/100g. O ácido ascórbico só foi quantificado nos citrinos num intervalo de teores de 70 a 119 mg/100g.

Em resumo, globalmente os açúcares estão maioritariamente presentes nos frutos e os ácidos orgânicos nos hortícolas.

4.2. Trabalhos publicados

No decorrer do trabalho foram realizadas duas comunicações, sob a forma de painel, como ilustrado nas Figuras 4.1 e 4.2, apresentadas no 5º Simpósio de Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável (5PTAAS), que decorreu no Instituto Politécnico de Beja (IPBeja) a 7 de junho de 2019 (Lageiro *et al.*, 2019) e no 6º FÓRUM de Engenharia Química e Biológica (6º iFEQB), que decorreu no Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), no período de 7 a 9 de maio de 2019 (Paiva *et al.*, 2019).



1
Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I.P.



2
ISEL
INSTITUTO SUPERIOR
DE ENGENHARIA DE LISBOA



3
INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa


Caraterização do perfil de açúcares e ácidos orgânicos em subprodutos vegetais com vista à sua valorização

M. Lageiro^{1*}; F. Paiva^{1,2}; A. Santos^{1,3}; C. Serra²; E. M. Gonçalves¹; M. Moldão³; M. Abreu^{1,3}


¹ INIAV/UTI. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P., Unidade de Tecnologia e Inovação, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal.
² ISEL/IPL. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, R. Conselheiro Emídio Navarro 1, 1959-007 Lisboa, Portugal.
³ ISA/UL. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 349-017 Lisboa, Portugal
 *manuela.lageiro@iniav.pt

Resumo

Os hortofrutícolas apresentam uma enorme diversidade de açúcares e ácidos orgânicos que muito contribuem para as suas características sensoriais. Dada a grande produção de subprodutos da indústria de hortofrutícolas, é possível proceder-se à valorização destes subprodutos enquanto possíveis matrizes de produção de energia ou de extração de compostos fitoquímicos. Avaliaram-se o teor de açúcares e ácidos orgânicos (identificação e quantificação), em diferentes subprodutos hortofrutícolas, por aplicação de métodos analíticos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).



Materiais e Métodos



10 Hortofrutícolas

- Seleção dos hortofrutícolas a analisar.
- Seleção e optimização da extração (tipo de solvente, razão amostra (m)/solvente (V), temperatura, tempo).
- Seleção e optimização dos métodos de HPLC.
- Validação de métodos cromatográficos.

Extração de Açúcares^[1]

- Amostra: 2g
- Extração com água quente (20 mL)
- 2 min no *Ultraturrax*
- Adição de 2 mL de Carrez I e de Carrez II
- Perfazer o volume (100 mL) com água
- Filtração com papel de filtro rápido pregueado
- Filtração (0.22µm) para vial

Extração de Ácidos Orgânicos^[1]

- Amostra: 2g
- Extração ácida (20mL KH₂PO₄ (5 mM, pH 4,8))
- 2 min no *Ultraturrax*
- Centrifugação 5000g 30 min
- Descarte do precipitado
- Filtração (0.22µm) para vial

Quantificação: HPLC


Detetor, coluna, fase móvel, volume de injeção

RI - açúcares

PDA - ácidos orgânicos

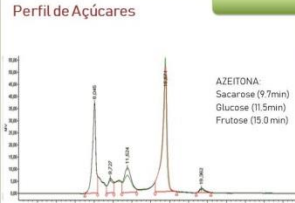
5 açúcares

9 ácidos orgânicos



Resultados


Perfil de Açúcares



AZEITONA:
Sacarose (9.7min)
Glucose (11.5min)
Frutose (15.0min)

Parâmetros de HPLC: Perfil e quantificação	
Açúcares	Ácidos orgânicos
HPLC-RI (30°C)	HPLC-PDA (210 nm)
Rezex RCM (70°C)	Aquasil C18 (30°C)
Água, 0.6 mL/min V inj = 20µL	Tampão fosfato 5mM pH 2.8, ajustado a 2.8 com H ₃ PO ₄ (85%) e 10% CH ₃ CN; 0.7 mL/min; V inj = 20µL

Perfil de Ácidos Orgânicos



AZEITONA:
Ácido oxálico (3.1 min)
Ácido tartárico (3.7 min)
Ácido ascórbico (4.2 min)
Ácido acético (4.9 min)
Ácido cítrico (5.6 min)
Ácido málico (6.2 min)
Ácido propiónico (8.3 min)
Ácido butírico (19.6 min)

Discussão

- Na análise dos ácidos orgânicos, a coluna Aquasil C18 mostrou melhor seletividade do que as outras colunas C18 testadas (Spherisorb ODS2, NovaPak, Chromolith). O pH da fase móvel influencia muito a forma dos picos obtidos e o seu tempo de eluição.
- Na análise de açúcares, testaram-se as colunas SugarPak, Aminex HPX 87H e Rezex RCM e a coluna Rezex RCM foi escolhida por ser mais simples de utilizar.
- A validação dos métodos será feita de acordo com o guia da Relacre^[3].

AGRADECIMENTOS

Projeto PDR2020-101-031856 – ProEnergy: Novos produtos alimentares a partir de frutos de baixo valor comercial e resíduos agro-industriais (2017 a 2020).

REFERÊNCIAS

[1] Andrés, V., Tenorio, M.D., Villanueva, M.J. *Food Chemistry*, 173, 1100 – 1106, 2015.
 [2] Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. *Food Chemistry*, Springer: Berlin, 2009.
 [3] Relacre *Guia 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química*, 2000.

Figura 4.1 - Poster apresentado no 5ºPTAAS, IPBeja (Lageiro et al., 2019).

6º FÓRUM DE ENGENHARIA QUÍMICA E BIOLÓGICA

Perfil e Quantificação de Açúcares e Ácidos Orgânicos em Hortofrutícolas por HPLC

Paiva, F.^{1,2}, Abreu, M.¹, Serra, M. C.², Lageiro, M. M.^{1*}

iniav ¹Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária IP, Unidade de Tecnologia e Inovação.
 INIAV/UTI-Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras

ISEL ²Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Área Departamental de Engenharia Química.
 ISEL/DEQ-R, Conselheiro Emídio Navarro 1, 1959-007 Lisboa.

*manuela.lageiro@iniav.pt

Resumo

Açúcares e ácidos orgânicos são compostos amplamente representados nos hortofrutícolas constituindo os seus principais sólidos solúveis¹. Estes compostos apresentam diferentes funcionalidades nas características organolépticas, doçura e textura, bem como, um papel importante na conservação dos alimentos². A caracterização qualitativa e quantitativa de açúcares e ácidos orgânicos pode ser importante para a garantia da qualidade e autenticidade de sumos de frutos, bem como para avaliar a estabilidade microbiológica durante o armazenamento¹. Com base na pesquisa bibliográfica realizada procedeu-se à selecção e optimização de métodos de extracção e quantificação por HPLC de açúcares e ácidos orgânicos em hortofrutícolas efectuando testes com diferentes solventes (água, etanol, tampão fosfato), tempo e temperatura de extracção. A selecção e optimização dos métodos de quantificação por HPLC foi efectuada em função: do tipo de coluna, fase móvel, detector, tempo, temperatura.

Materiais e Métodos

30 Hortofrutícolas

Preparação de soluções: (extracção, padrões e fase móvel)

Amostragem de frutos e vegetais: (selecção, corte, trituração e pesagem)

Selecção e optimização da extracção:

Solvente (água, metanol, tampão fosfato) tempo, temperatura

Selecção e optimização dos métodos de HPLC:

HPLC (coluna, fase móvel, Volume de injeção, detector)

RI - açúcares
PDA - ácidos orgânicos

Extracção de Açúcares^[1]

- Amostra: 2 g
- Extracção com água quente (20 mL)
- 2 min no *Ultraturrax*
- Adição de 2 mL de Carrrez I e de Carrrez II
- Adição de água até volume de 100 mL
- Filtração com papel de filtro rápido pregueado
- Filtração (0.22µm) para vial

Extracção de Ácidos Orgânicos^[1]

- Amostra: 2 g
- Extracção ácida (20 mL KH₂PO₄ (5 mM, pH 4,8))
- 2 min no *Ultraturrax*
- Centrifugação 5000g 30 min
- Descarte do precipitado
- Filtração (0.22µm) para vial

9 ácidos orgânicos
5 açúcares

Colunas testadas: C18 (Spherisorb ODS2, NovaPak, Chromolith, Aquasil); SugarPak, Aminex HPX 87H e Rezex RCM

Resultados

Parâmetros de HPLC: Perfil e quantificação	
Açúcares	Ácidos orgânicos
HPLC-RI (30°C)	HPLC-PDA (210 nm)
Rezex RCM (70°C)	Aquasil C18 (30°C)
Água, 0.6 mL/min V inj = 20µL	Tampão fosfato 5mM pH 2.8, ajustado a 2.8 com H ₃ PO ₄ 85%; 0.7 mL/min; V inj = 20µL

Açúcares
Padrão misto de lactose, glucose, sacarose, manose frutose (10 mg/mL), por ordem de eluição.

Ácidos Orgânicos
Padrão misto de ácido oxálico (150 mg/mL), ácido tartárico, láctico, ascórbico, acético, cítrico, propiónico, láctico, butírico, e (3000 mg/ml), por ordem de eluição.

Discussão e Conclusões

- Na análise dos ácidos orgânicos, a coluna Aquasil C18 mostrou melhor selectividade do que as outras colunas testadas e o pH da fase móvel influencia muito a forma dos picos obtidos e o seus tempos de eluição.
- Na análise de açúcares, a coluna Rezex RCM é mais simples de utilizar do que a SugarPak.
- A validação dos métodos será feita de acordo com o guia da Relacre^[3].

AGRADECIMENTOS

Projecto PDR2020-101-031856 – ProEnergy: Novos produtos alimentares a partir de frutos de baixo valor comercial e resíduos agro-industriais (2017 a 2020).

REFERÊNCIAS

- [1] Andrés, V., Tenorio, M.D., Villanueva, M.J. *Food Chemistry* 173, 1100–1106, 2015.
 [2] Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. *Food chemistry*, Springer: Berlin, 2009.
 [3] Relacre *Guia relacre 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química*, Relacre, 2000. ISEL, 7 a 9 de maio de 2019.



IFEQB

Figura 4.2 - Poster apresentado no 6º iFEQB, ISEL (Paiva et al., 2019).

4.3. Trabalho futuro

Em relação a trabalho futuro sugere-se um estudo de determinação conjunta de açúcares e ácidos orgânicos com outra coluna, como por exemplo a Rezex ROA da *Phenomenex*.

De forma a tornar o método mais eficiente para as matrizes em estudo deve-se aperfeiçoar os métodos utilizados, de modo a conseguir melhor separação, identificação e quantificação de outros açúcares (ex: estaquiose, rafinose e manose) e outros ácidos orgânicos (ex: fumárico e succínico), além dos determinados neste trabalho.

Sugere-se também fazer o ajuste da gama de trabalho para concentrações inferiores nos açúcares e verificar a adequabilidade dos limites de quantificação e de deteção.

Relativamente à temática de preparação da amostragem sugere-se a realização de uma homogeneização total da amostra antes de se retirar a amostragem para a análise, a fim de que não existam diferenças grandes entre valores de amostras do mesmo hortofrutícola, dado que teores de açúcares e ácidos orgânicos variam muito na casca, polpa, talos e sementes. Sugere-se ainda, realizar a extração sem o congelamento prévio das amostras para evitar perdas de analitos.

Propõe-se a análise dos analitos por HPLC-MS, pois a identificação dos açúcares por RI é apenas baseada nos tempos de retenção não sendo específica.

Quanto aos ácidos orgânicos eles possuem espectros muito semelhantes e a sua identificação pelos espectros UV torna-se difícil e acaba por ser feita com base nos tempos de retenção, pelo que também seria útil a análise por HPLC-MS. Sugere-se ainda que a determinação do ácido ascórbico seja realizada de acordo com a norma europeia prEN 14130 (2000).

Durante a realização do trabalho prático surgiram alguns obstáculos relativamente a quantificação dos ácidos orgânicos para aqueles que possuem mais do que uma constante de dissociação, como é o caso do ácido málico, pois o número de picos obtidos no cromatograma depende do pH da amostra e da fase móvel, este ácido foi quantificado recorrendo à área do maior pico, no entanto, sugere-se realizar a quantificação pela soma das áreas dos diferentes picos obtidos para esse ácido.

O conhecimento da composição de açúcares e ácidos orgânicos nas matrizes estudadas mostrou-se relevante pois pretende-se valorizar hortofrutícolas com baixo ou nulo valor comercial, bem como subprodutos e resíduos da indústria de hortofrutícolas que, para além de não serem valorizados, constituem hoje um problema ambiental.

Capítulo 5
BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

Akalin, A.S., Göncü, S., e Akbaş, Y. (2002). Variation in Organic Acids Content during Ripening of Pickled White Cheese. *Journal of Dairy Science* 85, 1670–1676.

Amarante, Jr., O.P. de, Caldas, E.P.A., Brito, N.M., Santos, T.C.R. dos, e Vale, M.L.B.F. (2001). Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. *Cad. Pesq.* pp. 116–131.

Andrés, V., Villanueva, M.J., Mateos-Aparicio, I., e Tenorio, M.D. (2014). Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity of mixed beverages based on fruit juices with milk or soya. *J. Food Nutr. Res.* 10, 71–80.

Andrés, V., Tenorio, M.D., e Villanueva, M.J. (2015). Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages. *Food Chemistry* 173, 1100–1106.

AOAC 980-13-1980 (1990). Fructose, Glucose, Lactose, Maltose, and Sucrose in Milk Chocolate - Liquid Chromatographic Method. *JAOAC* 63, 595.

AOAC 986.13 (1986). Quinic, Malic, and Citric Acids in Cranberry Juice Cocktail and Apple Juice. *JAOAC* 69, 594.

Araújo, J.M.A. (2004). *Química de Alimentos: teoria e prática*. Viçosa: UFV.

Aubert, C., Bony, P., Chalot, G., Landry, P., e Lurol, S. (2014). Effects of Storage Temperature, Storage Duration, and Subsequent Ripening on the Physicochemical Characteristics, Volatile Compounds, and Phytochemicals of Western Red Nectarine (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 4707–4724.

Barcia, M.T., Jacques, A.C., Pertuzatti, P.B., e Zambiasi, R.C. (2010). Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina* 31, 381–390.

Barros, L., Baptista, P., Correia, D., Casal, S., Oliveira, B., e Ferreira, I. (2007). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry* 105, 140–145.

Brito, N.M., Amarante Junior, O.P., Polese, L., e Ribeiro, M.L. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba* 13, 129–146.

Camargo, F.A. de O., Zonta, E., Santos, G. de A., e Rossiello, R.O.P. (2001) Physiological aspects and characterization of volatile organic acids toxicity on plants. *Ciência Rural*. 31:3 523-529.

Campbell, M.K. (2003). *Bioquímica*. Porto Alegre: Artmes.

Cassiano, N.M., Barreiro, J.C., Martins, L.R.R., Oliveira, R.V., e Cass, Q.B. (2009). Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova* 32, 1021–1030.

Cecchi, H.M. (2003). *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. rev. Campinas. Unicamp, p. 207.

Chen, J., Wang, Z., Wu, J., Wang, Q., e Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of eight pear cultivars grown in China. *Food Chemistry* 104, 268–275.

Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C., e Amati, A. (2005). Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 121–130.

Choi, J.H., Yim, S.H., Cho, K.S., Kim, M.S., Park, Y.S., Jung, S.K., e Choi, H.S. (2015). Fruit quality and core breakdown of 'Wonhwang' pears in relation to harvest date and pre-storage cooling. *Scientia Horticulturae* 188, 1–5.

Chust, R.B. (1990). Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC). *Boletim SPQ* 39, 43–53.

Claessens, H.A. (2001). Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 20, 21.

Costa, I. (2012). Maturação em queijo dos Açores Determinação de ácidos orgânicos e metabolismo do lactato. Tese MSc. ISA/UL.

Costa, J.C.D. (2014). Validação de um Método de Cromatografia de Alta Eficiência para Determinação de Conservantes em Géneros Alimentícios. Tese MSc.ISEL.

Costa, M.P. da, Frasao, B. da S., Lima, B.R.C. da C., Rodrigues, B.L., e Junior, C.A.C. (2016). Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC-DAD-RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. *Talanta* 152, 162–170.

Crestani, C.E., Bernardo, A., Costa, C.B.B., e Giuliatti, M. (2018). Experimental data and estimation of sucrose solubility in impure solutions. *Journal of Food Engineering*. 218, 14–23.

Damodaram, S., Parkin, K.L., e Fennema, O. R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed.

Daniel, C., e Harris (2005). *Análise Química Quantitativa*. LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. Rio de Janeiro.

Degani, A.L.G., Cassiano, Q.B., e Vieira, P.C. (1998). *Cromatografia: um breve ensaio*. *Atualidades em Química*. 21-25.

DGS (2005). *Frutos, Legumes e Hortaliças*. Direcção Geral da Saúde. Lisboa.

Ehling, S., e Cole, S. (2011). Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Enhanced Tool for Authenticity Testing. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2229–2234.

Engelhardt, H. (2011). *Handbook of HPLC*. Taylor and Francis Group.

Eurachem (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2nd Edition. Available from www.eurachem.org.

Federici, F., Fava, F., Kalogeralis, N., e Mantzavinos, D. (2009). Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill waste waters. *J Chem Technol Biotechnol*. 895–900.

Figueiredo, T.M.P. (2012). Validação de métodos analíticos: Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar. Tese MSc. UCoimbra.

Font i Forcada, C., Gogorcena, Y., e Moreno, M.A. (2013). Fruit sugar profile and antioxidants of peach and nectarine cultivars on almondxpeach hybrid rootstocks. *Scientia Horticulturae* 164, 563–572.

Fountain, K.J., Hudalla, C., McCabe, D., e Morrison, D. (2009). UPLC-MS Analysis of carbohydrates. *Waters Application Notes* 5.

Gancedo, M.C., e Luh, B.S. (1986). HPLC Analysis of Organic Acids and Sugars in Tomato Juice. *Journal of Food Science* 51, 571–573.

Georgelis, N., Fencil, K., e Richael, C.M. (2018). Validation of a rapid and sensitive HPLC/MS method for measuring sucrose, fructose and glucose in plant tissues. *Food Chemistry* 262, 191–198.

Girard, B., e Koop T.G. (1998). Physicochemical characteristics of selected sweet cherry cultivars. *J. Agr. Food Chem.* 46, 471–476.

- Goeij, S. (2013). Quantitative analysis methods for sugars. Tese MSc Universidade de Amesterdao.
- GPP, MADRP (2007). Frutas, hortícolas e flores. Gabinete de Planeamento e Projetos do MADRP, Portugal.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., e Mey- beck, A. (2011). Global food losses and Food waste. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1-23.
- Harris, Daniel C. (2005) Análise Química Quantitativa. 6ª ed. LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. Rio de Janeiro.
- Hönow, R., e Hesse, A. (2002). Comparison of extraction methods for the determination of soluble and total oxalate in foods by HPLC-enzyme-reactor. Food Chemistry 78, 511–521.
- Horwitz, W. (1980). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (Washington: Ass. of Official Analytical Chemists).
- Huber, L. (2010). Validation of Analytical Methods - Agilent.pdf. Agilent Technologies.
- ICH (1995). Validation of Analytical Procedures: Methodology, International Conference on Harmonisation.
- ICH Guideline (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1).
- INE (2018). Estatísticas culturas agrícolas. Portugal.
https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpgid=ine_main&xpid=INE, acedido abril 2019.
- INIAV (2018). Métodos internos de análise química. Gabinete da Qualidade.
- INMETRO (2016). Normalização e qualidade industrial - Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, DOQ-CGCRE-008.
- INSA (2019). Tabela da Composição de Alimentos. Portugal.
https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpgid=ine_main&xpid=INE, acedido em fevereiro 2019.
- IPAC (2011). Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos.
<http://www.ipac.pt/>, acedido em abril 2019.
- ISO 5725-3 (2018) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parte 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method, International Standard Organization.
- ISO 8466-1 (1990). Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of Performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.
- ISO 8466-2 (1993). Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 2: Calibration strategy for non-linear second order calibration functions.
- ISO 10504 (2013). Starch derivatives — Determination of the composition of glucose syrups, fructose syrups and hydrogenated glucose syrups — Method using high-performance liquid chromatography.
- ISO 11843-5 (2008). Capability of detection - Part 5: Methodology in the linear and non-linear calibration cases.
- ISO 17025 (2005) Requisitos Gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibrações.
- ISO 22662, IDF 198 (2007). Milk and milk products — Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography.

Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S., e Winkelhausen, E. (2014). Oligosaccharide Profile in Fruits and Vegetables as Sources of Prebiotics and Functional Foods. *International Journal of Food Properties* 17, 949–965.

Kader, A.A. (2008). Flavor quality of fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 88, 1863–1868.

Karadeniz, F. (2004). Main Organic Acid Distribution of Authentic Citrus Juices in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 28, 267–271.

Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., e Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal* 91, 187–192.

Khosravi, F., Rastakhiz, N., Iranmanesh, B., e Jafari Olia, S.S.S. (2015). Determination of Organic Acids in Fruit juices by UPLC. *Int J Life Sci* 9, 41–44.

Kowalski, J. (2019). Simple, Reliable HPLC Analyses of Organic Acids. Restek Corporation, U.S., 4.

Lageiro M., Paiva F., Santos A., Serra C., Gonçalves E., Moldão M., e Abreu M. (2019) Caracterização do perfil de açúcares e ácidos orgânicos em subprodutos vegetais com vista á sua valorização. 5PTAAS Abstrat Book, 5º Simpósio de Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável, IPBeja, 7 junho, Beja.

Lanças, F. M. (2009) A cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: Finalmente Compatíveis? *Scientia Chromatographica*, V.1, nº2. São Paulo.

Lindle, The Group (2013). Analytical Methods, High performance liquid chromatography, http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html. Acedido 10 out 2019.

Lee, C.Y., Shallenberger, R.S., e Vittum, M.T. (1970). Free sugars in fruits and vegetables. *New York's food and life sciences bulletin.* 1, 1-11.

Leite, F. (1996). Validação em Análise Química, Campinas: Átomo.

Leonel, S., Leonel, M., e Sampaio, A.C. (2014). Processamento de frutos de abacaxizeiro cv smooth cayenne: perfil de açúcares e ácidos dos sucos e composição nutricional da farinha de cascas. *Rev. Bras. Frutic.* 36, 433–439.

Lopez, E.F., e Gomez, E.F. (1996). Simultaneous Determination of the Major Organic Acids, Sugars, Glycerol, and Ethanol by HPLC in Grape Musts and White Wines. *Journal of Chromatographic Science* 34, 254–257.

López-Hernandez, J., Oruña-Concha, M.J., Simal-Lozano, J., Vázquez-Blanco, M.E., e González-Castro, M.J. (1996). Chemical composition of Padrón peppers (*Capsicum annuum* L.) grown in Galicia (N.W. Spain). *Food Chemistry* 57, 557–559.

Lu, X., Shoji, H., Song, G., Huang, J., Hiroshi, N., e Li, R. (2015). Simultaneous Quantitation of Organic Acids and Monosaccharides by High-Performance Liquid Chromatography. In *Proceedings of the International Conference on Chemical, Material and Food Engineering*, Kunming, Yunnan, China: Atlantis Press.

Mahmood, T., Anwar, F., Abbas, M., Boyce, M.C., e Saari, N. (2012). Compositional Variation in Sugars and Organic Acids at Different Maturity Stages in Selected Small Fruits from Pakistan. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 1380–1392.

Martínez-Madrid, M.C., López-Gómez, E., Pretel, M.T., Sánchez-Bel, P., Egea, I., e García-Legaz, M.F. (2018). Changes in organic acid and sugars at ripening and after storage of three local plums. *Acta Horticulturae* 1025–1032.

Martins, A.F.S. (2016). Implementação e validação de métodos analíticos. Dissertação MSc. Universidade de Coimbra.

Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.-J., Zapata-Revilla, M.-A., e Tenorio-Sanz, M.-D. (2010). Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT - Food Science and Technology* 43, 1467–1470.

McMaster, M.C. (2007). *HPLC: A Practical User's Guide*, 2nd ed., Wiley & Sons Inc, New Jersey. p.3–14.

Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., e Veberic, R. (2012). Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *Journal of Food Science* 77, C1064–C1070.

Ministério da Agricultura, (2011). *Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica. CGAL/SDA* (Brasília: MAPA).

Molnár-Perl, I. (2000). Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food. *Journal of Chromatography A* 891, 1–32.

Muir, J.G., Rose, R., Rosella, O., Liels, K., Barrett, J.S., Shepherd, S.J., e Gibson, P.R. (2009). Measurement of Short-Chain Carbohydrates in Common Australian Vegetables and Fruits by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 57, 554–565.

Neto, F.R.A., e Nunes, D.S.S. (2003). *Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro, RJ,.

Nguyễn, H.V.H., e Savage, G.P. (2013). Oxalate content of New Zealand grown and imported fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 31, 180–184.

Oliveira, M.A.D., Cereda, M.P., Cabello, C., e Urbano, L.H. (2001). Quantificação de açúcares em pêssegos da variedade biuti, armazenados sob condições de ambiente e refrigeração. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23, 424–427.

Paiva, F., Abreu, M., Serra, M.C., e Lageiro, M.M. (2019) Perfil e Quantificação de Açúcares e Ácidos Orgânicos em Hortofrutícolas por HPLC. Livro de resumos do 6º FÓRUM de Engenharia Química e Biológica, ISEL, 7 a 9 de maio, Lisboa.

Paschoalino, J.E. (1997). *Hortalças acidificadas em conserva: riscos e cuidados*. Campinas: Informativo Fruthotec.

Pérez, A.G., Olías, R., Espada, J., Olías, J.M., e Sanz, C. (1997). Rapid determination of sugars, nonvolatile acids, and ascorbic acid in strawberry and other fruits. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3545–3549.

Phenomenex (2018). O que é HPLC e como funciona. <https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/>, acessado em fevereiro 2019.

prEN 14130 (2000). Quantitative determination of vitamin C by high performance liquid chromatography.

Raimundo, D.D. (2018). *Estratégias para redução e valorização de co-produtos de uma indústria hortofrutícola*. Tese MSc. ISA-UL.

Rangel, C.N., Carvalho, L.M.J. de, Fonseca, R.B.F., Soares, A.G., e Jesus, E.O. (2011). Nutritional value of organic acid lime juice (*Citrus latifolia T.*), cv. Tahiti. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 31, 918–922.

RDC (2010). Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao17_16_04_10.pdf, acessado em abril de 2019.

Relacre (2000). *Guia Relacre 13, Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Instituto Português da Qualidade, Portugal.

- Reuter, W.M. (2015). Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by HPLC and UV Detection. Application Note 012299_01. PerkinElmer, Inc.
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., e Melo, L.F.C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 27, 771–780.
- Rodrigues, D.P. (2016). Desenvolvimento e aplicação de modelo de calibração multivariada para determinação de açúcares e ácidos orgânicos em bebidas comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho. Tese MSc. Tecnológica Federal do Paraná.
- Saidani, F., Gimenez, R., Aubert, C., Chalot, G., Betran, J.A., e Gogorcen, Y. (2017). Phenolic, sugar and acid profiles and the antioxidant composition in the peel and pulp of peach fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 62, 126-133.
- Santos, C.E. (2013). Anuário brasileiro da fruticultura. Gazeta. Santa Cruz do Sul.
- Sargaço, B., Serra, C., e Vasco, E. (2017). Validation of an HPLC-DAD/UV method for the quantification of cyclamate in tabletop sweeteners: risk of exceeding the acceptable daily intake. *Food Additives & Contaminants: Part A* 34, 883–890.
- Scherer, R., Rybka, A.C.P., Ballus, C.A., Meinhart, A.D., Filho, J.T., e Godoy, H.T. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry* 135, 150–154.
- Sena Aquino, A.C.M., Azevedo, M.S., Ribeiro, D.H.B., Costa, A.C.O., e Amante, E.R. (2015). Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. *Food Chemistry* 172, 725–730.
- Sequeira, B.C. (2012). Análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais: aplicação de HPLC-SEC-UV-IR e língua eletrônica. Dissertação MSc. Instituto Politécnico de Bragança.
- Shau, S., Li, J., Wu, J., e Zhang, S. (2011). Characteristics of organic acids in the fruit of different pear species. *Citric Acid. African Journal of Agricultural Research*. 6, 2403-2410.
- Shaw, P.E., e Wilson, C.W. (1981). Determination of organic acids and sugars in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by high-pressure liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32, 1242–1246.
- Sigma (2019). Safety data sheet. <https://www.sigmaaldrich.com/united-kingdom/technical-services/datasheets.html>, acessado em março 2019.
- Silva, A.F.A. (2016). Validação de Métodos Analíticos para controlo de Qualidade de um Medicamento, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Dissertação MSc. Universidade Nova de Lisboa.
- Silva, R. do N., Monteiro, V.N., Alcanfor, J.D.X., Assis, E.M., e Asquieri, E.R. (2003). Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 23, 337–341.
- Siouffi, A.M., e Nollet, L.M.L. (2000). In *Food Analysis by HPLC*, (Marcel Dekker Inc), p. 1–54.
- Snow, L., Trass, M., Rivera, B., Klein, M., e Misa, A. (2015). Fast Analysis of Sucrose, Glucose, and Fructose Composition in Fruit Juices and Processed Beverages using Simplified HPLC Methodology. *Phenomenex Application Note TN-1182*, 8.
- Snyder L. R., Kirkland J. J., e Dolan J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3ª edição. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Stryer, L. (1992). *Bioquímica*. Koogan. Guanabara.
- Tonhi, E., e Collins, K.E. (2002). Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) Baseadas em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados. *Instituto de Química* 25.

- Voet, D., Voet, J., e Pratt, C. (1999). *Fundamentals of biochemistry*. John Wiley & Sons. NY.
- Walker, R.P., e Famiani, F. (2018). Organic Acids in Fruits: Metabolism, Functions and Contents. In *Horticultural Reviews*, I. Warrington, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 371–430.
- Wilson, A.L., e Downs, C.T. (2012). Fruit nutritional composition and non-nutritive traits of indigenous South African tree species. *South African Journal of Botany* 78, 30–36.
- Wu, C.S., Gao, Q.H., Guo, X.D., Yu, J.G., e Wang, M. (2012). Effect of ripening stage on physicochemical properties and antioxidant profiles of a promising table fruit 'pear-jujube' (*Zizyphus jujuba* Mill.). *Scientia Horticulturae* 148, 177–184.
- Xie L., Ye X., Liu D. e Ying Y. (2011). Prediction of titratable acidity, malic acid, and citric acid in bayberry fruit by near-infrared spectroscopy. *Food Research International* 44, 2198–2204.
- Xu, Y., Cui, B., Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G., e Shi, J. (2014). Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology* 69, 1–12.
- Zaky, A.S., Pensupa, N., Andrade-Eiroa, Á., Tucker, G.A., e Du, C. (2017). A new HPLC method for simultaneously measuring chloride, sugars, organic acids and alcohols in food samples. *Journal of Food Composition and Analysis* 56, 25–33.
- Zhang, W., Chen, K., Zhang, B., Sun, C., e Cai, C. (2005). Postharvest responses of chinese bayberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 11.
- Zhang, Q. (2015). Direct Carbohydrate Analysis in Beverages and Foods Using Pulsed Amperometric Detection or Charged Aerosol Detection. 7. PN71524-EN 09/16S. www.thermofisher.com/chromatography.
- Zheng, H., Zhang, Q., Quan, J., Zheng, Q., e Xi, W. (2016). Determination of sugars, organic acids, aroma components, and carotenoids in grapefruit pulps. *Food Chemistry* 205, 112–121.

ANEXOS

Anexo 1 - Tabelas da pesquisa bibliográfica.

A1.1. Açúcares

Tabela A1.1 - Pesquisa bibliográfica sobre quantificação de açúcares em hortofrutícolas.

Análito	Matriz	Extração	Tipo de detector λ (nm)	Pré-coluna Coluna T coluna (°C)	Mecanismo de Separação Eluição	Fase móvel	Caudal (ml/min) tr (min) V inj (μ l)	Referência
Sacarose Glucose Frutose Lactose	Sumo de frutos a base de leite e soja	As amostras foram diluídas com água grau HPLC e centrifugadas. O sobrenadante foi purificado através de um cartucho Strata-X 33 μ m previamente ativado com metanol e os analitos foram eluídos com água.	IR	Rezex RPM Pb ²⁺ 85	Cromatografia iônica Isocrática	Água Milli-Q	0,5 - -	Andrés <i>et al.</i> , 2015 Mateos-Aparicio <i>et al.</i> , 2010
Sacarose Glucose Frutose Sorbitol	Pêssego e nectarina	As amostras foram homogeneizadas com 10 mL de solução de extração composta por 800 mL de etanol e água Milli-Q. A mistura foi centrifugada a 20.000 x g durante 20 min a 4 ° C.	IR	Aminex HPX- 87C 85	- Isocrática	Solução destilada de água desionizada	0,6 20 -	Font i Forcada 2013
Sacarose Glucose Frutose Galactose Arabinose	Vagem de ervilha, vagem de feijão e soja.	As amostras foram homogeneizadas com etanol a 85% em mistura constante a 60-70 ° C durante 30 min.	IR	HPX-87P 85	- Isocrática	Água Milli-Q	0,5	Mateos-Aparicio <i>et al.</i> , 2010
Sacarose Glucose Frutose	Pêssegos (Bluti)	Cada amostra foi composta por 2 frutos triturados conjuntamente, dando origem ao extrato aquoso. Uma alíquota de material fresco triturado (1 grama) foi diluída em 10 ml de água e, em seguida, centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm e injetada em cromatógrafo HPLC, utilizando-se filtro de 0,22 μ m.	IR	pré-coluna 125- 0119 coluna HPX-87P 80	- Isocrática	Água desmineralizada, desionizada e filtrada	0,8 - 15	Oliveira 2001
Sacarose Glucose Frutose Galactose Arabinose	Pêssegos (casca e polpa)	Açúcares e ácidos foram extraídos com 10 mL de água desionizada, homogeneizada por 60 s usando um Ultra-Turrax. Após centrifugação (14000g, 10 min, 4 ° C), o sobrenadante foi filtrado e diretamente injetado em HPLC.	IR em série com PDA (210)	Carbo-H (Phenomenex) Rezex ROA- Orgânica H+	Exclusão iônica	0,005 N de H ₂ SO ₄	0,4 10 -	Saidani <i>et al.</i> , 2017 Aubert <i>et al.</i> , 2014.

Análito	Matriz	Extração	Tipo de detector λ (nm)	Pré-coluna Coluna T coluna (°C)	Mecanismo de Separação de Separação Eluição	Fase móvel	Caudal (ml/min) tr (min) V inj (μ l)	Referência
Sacarose Glucose Frutose Sorbitol Maltose			IR	SUPELCO SIL LC-NH2 30		acetonitrilo: etanol: água (75: 8: 17)	2 20 -	Manual da coluna
Monossacáridos Oligossacáridos			IR UV-190	SUPELCO SIL LC-NH2 30		acetonitrilo: água (85:15) acetonitrila: água (60:40)	2 10 -	Manual da coluna
Sacarose Frutose Glucose Sorbitol	Toranja	2 g polpa em pó homogeneizados com 5,0 ml de etanol frio (80%). Incubar por 20 min em banho-maria a 35 ° C e centrifugar a 10.000 g, 10 min. Repetir três vezes e juntar sobrenadantes. Ajustar volume total a 25 ml com etanol a 80%. Secar a vácuo (1 ml) a 45 ° C. Dissolver resíduo em 0,5 ml de água destilada e filtrar. Analisar açúcares e ácido orgânicos.	IR	Carboidrato ZORBAX Agilent (22-25)		acetonitrilo: água (80:20, v / v)	1,4 - -	Zheng <i>et al.</i> , 2016 Zhang <i>et al.</i> , 2005 Gancedo e Luh 1986
Glucose Frutose Amido Pectina	Pimentos verdes		IR	spherisorb NH2 28		acetonitrilo: água (90:10 v/v).	1,4	López-Hernandez <i>et al.</i> , 1996
Sacarose Glucose Frutose	Abacaxi	A polpa dos frutos foi desintegrada em liquidificador e filtrada à vácuo para a separação das fibras e a obtenção do suco. que foi em seguida injetado como amostra no HPLC.	IR	HPX 87P 80		água	0,6	Leonel <i>et al.</i> , 2014
Sacarose Glucose Frutose	Sumo de limão	O sumo de limão ácido foi extraído usando um multiprocessador acoplado a um finalizador para remover a polpa. O suco de frutas foi acondicionado.	IR	Waters 044355- Carboidrato	Fase reversa Isocrática	água Milli Q: acetonitrilo 25:75	1	Rodrigues 2016 Rangel <i>et al.</i> , 2011

Análito	Matriz	Extração	Tipo de detector λ (nm)	Pré-coluna Coluna T coluna (°C)	Mecanismo de Separação e Eluição	Fase móvel	Caudal (ml/min) tr (min) V inj (μ l)	Referência
Sacarose Glucose Frutose	Fruta Chinesa de amora	Três gramas de fruta foram homogeneizados em 5,0 ml de solução fria de etanol (80%) e agitados durante 10 min a 35 ° C. O homogenato foi filtrado e o resíduo foi extraído duas vezes com 80% de etanol frio. Os extratos foram centrifugados a 5000 x g durante 5 min e os extratos combinados foram evaporados sob vácuo a menos de 35 ° C até o etanol ser removido e o volume completado até 1 ml com água destilada. O extrato resultante foi utilizado para análises de açúcares e ácidos orgânicos.	IR	Amino	- Isocrática	acetonitrilo: água (80:20)	1,2	Zhang <i>et al.</i> , 2005
Sacarose Glucose Frutose Sorbitol	Nectarina vermelha occidental	Um grama de pó congelado adicionado a 20 mL de água milli-Q foi homogeneizada por 60 s no Ultra-Turrax. Após centrifugação (14000g, 10 min, 4 ° C), o sobrenadante foi filtrado e injetado no HPLC.	IR com temperatura 34°C	Carbo-H (Phenomenex) Rezex ROA- Organic H + 27	exclusão iônica Isocrática	0,005 N de H ₂ SO ₄	0,4	Aubert <i>et al.</i> , 2014
Sacarose Glucose Frutose.	Sumo de frutos	Amostras diluídas a 1:10 (v/v) com a fase móvel, filtradas em membrana de acetato de celulose 0,22 μ m antes da injeção. Pré-tratamento com o cartucho Sax foi testado o objetivo de separar os compostos neutros (açúcares e álcoois) dos ácidos.	IR em série com UV-visível (210)	Aminex HPX 87H 25	Permutadora de Catiões Isocrática	água destilada e metanol	0,5	Chinnici <i>et al.</i> , 2005
Sacarose Glucose Frutose Sorbitol Xilitol Manitol Rafinose Estaquiose	Matrizes vegetais	Amostra liofilizada e extraída com etanol 85% à 50°C com agitação. Centrifugação 3000g durante 15min. Os sobrenadantes evaporados no evaporador rotativo à 50°C até a secura. Resíduo dissolvido em 1,5 mL de água desionizada e filtrado com filtro 0,45 μ m	RI	Zorbax Carbohidratato Pré coluna Zorbax NH ₂ 30		acetonitrilo: água (75:25)	1,4	Jovanovic- Malinowska <i>et al.</i> , 2014

Analito	Matriz	Extração	Tipo de detector λ (nm)	Pré-coluna Coluna T coluna (°C)	Mecanismo de Separação Eluição	Fase móvel	Caudal (ml/min) tr (min) V inj (μ l)	Referência
Glucose Frutose	Polpa de tomate	20g de suco de tomate foram refluxados com 60 mL de etanol 80% por 1 hora em banho-maria a 80 ° C. O extrato foi filtrado através do papel de filtro. O material no frasco foi enxaguado com 150 mL de etanol, os extratos combinados foram concentrados num evaporador rotativo a vácuo. O extrato concentrado foi feito para 25 mL com água desionizada e filtrado através de papel de filtro. Cartuchos SEP-PAK C18 foram usados para reter os pigmentos presentes nos extratos. Os cartuchos foram primeiro saturados com 3 mL de acetonitrila, lavados com 10 mL de água e secos com dois volumes de ar. O extrato foi passado por dois cartuchos e, em seguida, através de um filtro Milipore de 0,45 micrômetros.	Refratômetro diferencial R-401	Micro-Bondapak coluna 4 mm i.d. x 30 cm (Millipore-Waters) e microguard 3,8 mm i.d. X 4 cm temperatura ambiente (22-25 ° C).	- Isocrática	água:acetonitrilo (80:20 v / v)	1,5 - 30 μ L	Gancedo e Luh 1986

A1.2. Ácidos orgânicos

Tabela A1.2 - Pesquisa bibliográfica: quantificação de ácidos orgânicos em hortofrutícolas.

Ácidos	Matriz	Extração	Tipo de detector λ (nm)	Coluna T coluna (°C)	Mecanismo de Separação Eluição	Fase móvel	Caudal (ml/min) Vol. injeção (ul)	Referência
Málico Tartárico Cítrico	Sumo de frutos a base de leite e soja	Diluídas com ácido metafosfórico a 4,5% e filtradas por filtros de membrana de nylon de 0,45 μ m.	PDA (215)	Luna RP-C18 25	Fase Reversa Isocrática	água Milli-Q, acidificada com H ₂ SO ₄ (12M). 2,55 \pm 0,05	0,9	Andrés <i>et al.</i> , 2015
Málico Cítrico Quínico	Pêssego (casca e polpa)	Extraídos com 10 mL de água desionizada. Homogeneização por 60 s no Ultra-Turrax. Após centrifugação (14000g, 10 min, 4 °C), o sobrenadante foi filtrado e diretamente injetado em HPLC.	IR em série com PDA (210)	Rezex ROA-Organic H+ 27	Exclusão iônica -	0,005 N de H ₂ SO ₄	0,4 10	Saidani <i>et al.</i> , 2017 Aubert <i>et al.</i> , 2014
Oxálico Tartárico Cítrico Málico	Bayberry Chineses dos tipos Biqi, Hunanzhong e Wuzhong	3g homogeneizados com 5 mL de etanol 80% agitado durante 10 min a 35°C centrifugados a 5000g, durante 5min. Evaporação dos extratos combinados a vácuo, 35°C. Ressuspensão do resíduo em 1mL de água destilada	UV-visível (210)	ODS-C18 35	- -	hidrogeno fosfato de amônio 2,7	1,2 20	Zhang <i>et al.</i> , 2005
Oxálico Tartárico Málico Cítrico Quínico Aconítico	Taranja	2g de polpa em pó foram homogeneizados com 5,0 ml de etanol frio (80%). A solução foi então incubada por 20 min em banho-maria a 35 ° C e centrifugada a 10.000g por 10 min (repetido três vezes) e os sobrenadantes foram combinados. O volume total foi então ajustado para 25 ml com etanol a 80%. A partir desta mistura, 1 ml foi seco sob vácuo a 45 ° C e o resíduo foi ressuspensão em 0,5 ml de água destilada e filtrado através de um filtro de seringa. A solução filtrada foi então injetada.	PDA (210)	ODS-C18	- -	fosfato diamônico	0,5 20	Zheng <i>et al.</i> , 2016

Análito	Matriz	Extração	Tipo de detector λ (nm)	Coluna T coluna (°C)	Mecanismo de Separação Eluição	Fase móvel pH	Caudal (ml/min) Vol. injeção (μ l)	Referência
Oxálico Málico Cítrico Quinínico Fumárico Ascórbico	Pimentos verdes		UV-visível 215 e 245 para oxálico e ascórbico	ODS-C18		água com elevado grau de pureza e ácido metafosfórico	0,5 20	López-Hernández <i>et al.</i> , 1996
Oxálico Tartárico Cítrico Málico	Amora	Três gramas de fruta foram homogeneizados em 5,0 ml de solução fria de etanol (80%) e agitados durante 10 min a 35 ° C. A solução foi filtrada e o resíduo foi extraído duas vezes com 80% de etanol frio. Os extratos foram centrifugados a 5000g durante 5 min e os extratos combinados foram evaporados sob vácuo a menos de 35 °C até o etanol ser removido e o volume completado até 1 ml com água destilada. O extrato resultante foi utilizado para análises de açúcar e ácido orgânico.	UV-visível (210)	ODS-C18	- -	(NH ₄) H ₂ PO ₄ 2,7	0,5 20	Zhang <i>et al.</i> , 2005
Oxálico Málico Cítrico Galacturônico	Polpa de tomate	10 g amostra Cartucho SEP PAK C18	IR	Bio Rad Aminex HPX-87 60	Exclusão iônica Isocrática	ácido sulfúrico 0,005M	0,6 à 1200psi 20	Gancedo e Luh (1986)
Oxálico Tartárico Lático Acético Málico Xiquimico Quínico Succínico Fumárico.	Pereira da Ásia Oriental (Pyrus pyrifolia)	Polpa de péra (1 g) foi homogeneizada com 5 ml de ácido metafosfórico a 0,2% e em seguida centrifugada a 10 000g durante 15 min. Os precipitados foram extraídos novamente com 4 ml de ácido metafosfórico a 0,2%. Os sobrenadantes das duas extrações foram combinados, e o volume foi ajustado para 10 ml e passou por um filtro de seringa antes da injeção.	UV-visível (210)	XB-C18 35	Fase reversa Isocrática	ácido metafosfórico	1 10	Shau <i>et al.</i> , 2011

Análito	Matriz	Extração	Tipo de detector λ (nm)	Coluna T coluna (°C)	Mecanismo de Separação Eluição	Fase móvel pH	Caudal (ml/min) Vol. injeção (μ l)	Referência
Cítrico Málico Ascórbico	Abacaxi	A polpa dos frutos foi desintegrada em liquidificador industrial e procedeu-se à filtração a vácuo para a separação das fibras e a obtenção do suco, que foi em seguida injetado como amostra no HPLC.	IR	HPX 87H 60	Troca iônica	ácido sulfúrico 0,005M	0,6	Leonel <i>et al.</i> , 2014
Oxálico Ascórbico Dihidroascórbico Cítrico Málico Galacturônico, Quínico, Succínico, Xiquímico Fumárico.	Sumo de frutos	As amostras, diluídas a 1:10 (v/v) com a fase móvel, foram filtradas em celulose de 0,22 mm membrana de acetato antes da injeção direta. Em comparação com este procedimento simplificado, o pré-tratamento com o cartucho Sax foi testado o objetivo de separar os compostos neutros (por exemplo, açúcares e álcoois) dos ácidos. O cartucho (3 mL / 500 mg) foi condicionado preliminarmente com metanol (3 mL) e água bidestilada.	IR em série com UV-visível (210nm.)	Aminex HPX 87H 25	Permuta catiônica	ácido fosfórico 0,002M	0,5	Chinnici <i>et al.</i> , 2005
Cítrico Málico Quínico	Nectarina	1 g de pó congelado adicionado a 20 mL de água milli-Q foi homogeneizado por 60 s no Ultra-Turrax. Após centrifugação (14000g, 10 min, 4 ° C), o sobrenadante foi filtrado e injetado no HPLC.	RI em série com PDA (210nm)	Rezex ROA- Organic H+ 27	Exclusão iônica Isocrático	0,005 N de H ₂ SO ₄	0,4 10	Aubert <i>et al.</i> , 2014

Anexo 2 - Calibração: retas, parâmetros e resíduos.

A2.1. Açúcares

a) Sacarose

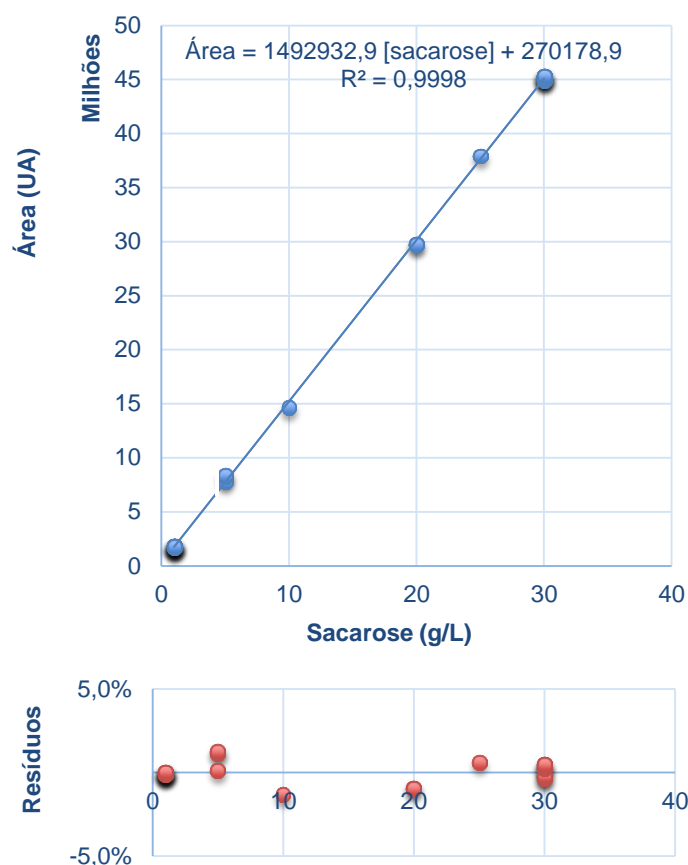


Figura A2.1.1 - Retas de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de sacarose e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.1.1 - Parâmetros de calibração linear da sacarose.

Declive	1492932,9 ± 4062,3
Ordenada na origem	270178,9 ± 76324,4
R	0,9999
Desvio padrão dos resíduos	0,61%
LD (g/L)	0,17
LQ (g/L)	0,51
N	25
S_{y/x}	76324,4

b) Glucose

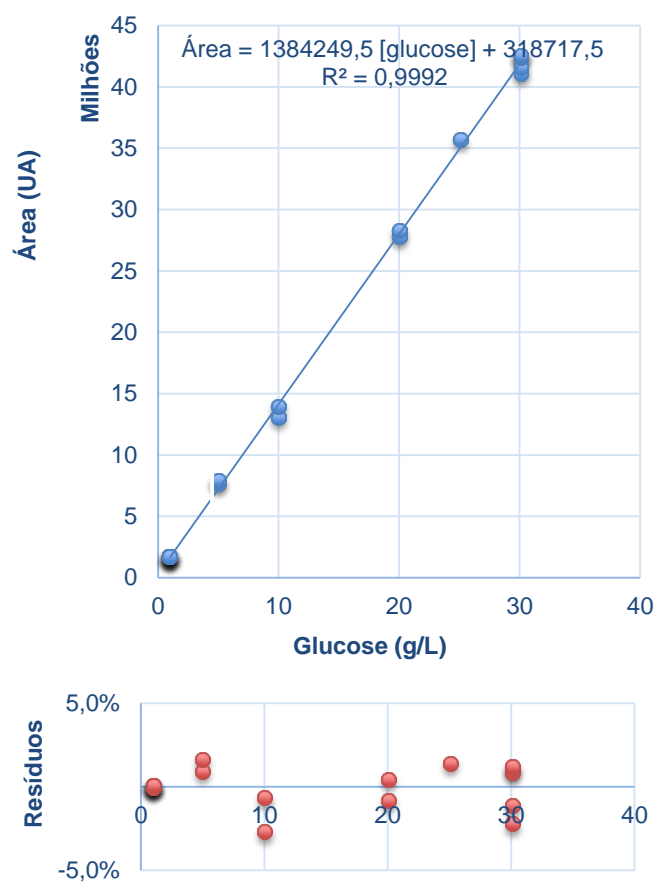


Figura A2.1.2 - Reto de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de glicose e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.1.2 - Parâmetros de calibração linear da glicose.

Declive	1384249,5 ± 9265,8
Ordenada na origem	318717,5 ± 167817,5
R	0,9996
Desvio padrão dos resíduos	1,15%
LD (g/L)	0,40
LQ (g/L)	1,21
N	19
S_{y/x}	167817,5

c) Frutose

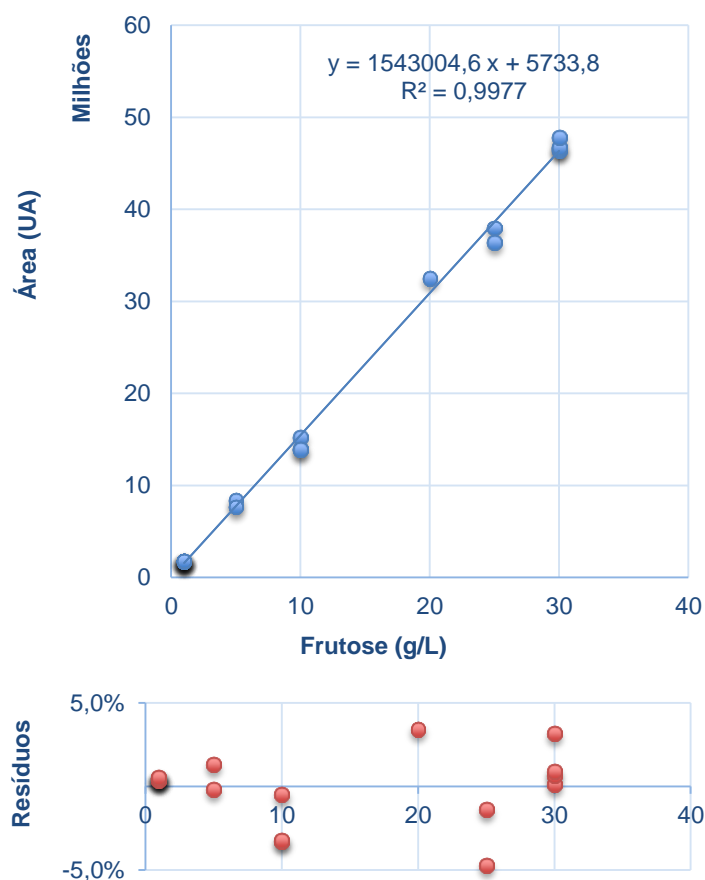


Figura A2.1.1 - Retas de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de frutose e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.1.3 - Parâmetros de calibração linear da frutose.

Declive	1543004,6 ± 17618,5
Ordenada na origem	5733,8 ± 295151,3
R	0,9988
Desvio padrão dos resíduos	1,95%
LD (g/L)	0,63
LQ (g/L)	1,91
N	20
S_{y/x}	295151,3

d) Sorbitol

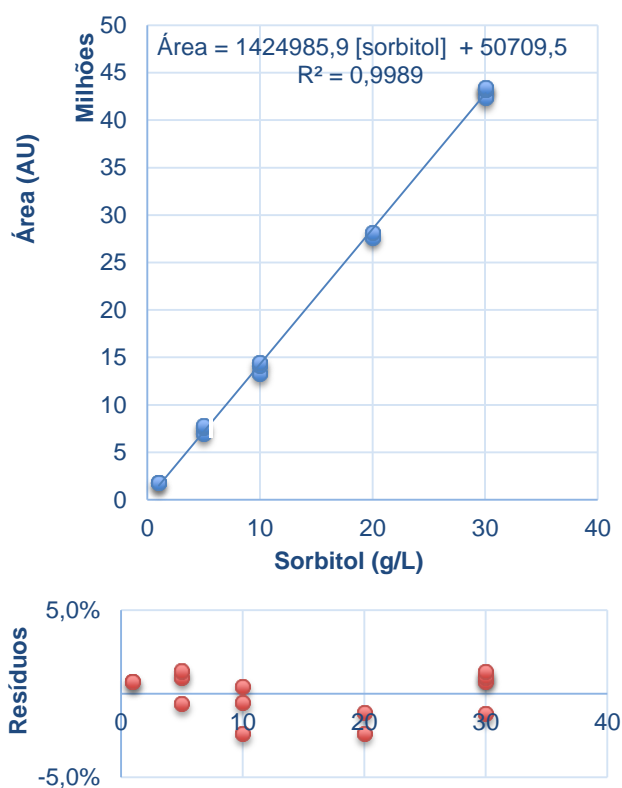


Figura A2.1.2 - Reto de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de sorbitol e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.1.4 - Parâmetros de calibração linear do sorbitol

Declive	1424985,9 ± 12987,5
Ordenada na origem	50709,5 ± 253002,6
R	0,9995
Desvio padrão dos resíduos	1,29%
LD (g/L)	0,59
LQ (g/L)	1,78
N	15
S_{y/x}	253002,6

A2.2. Ácidos orgânicos

a) Oxálico

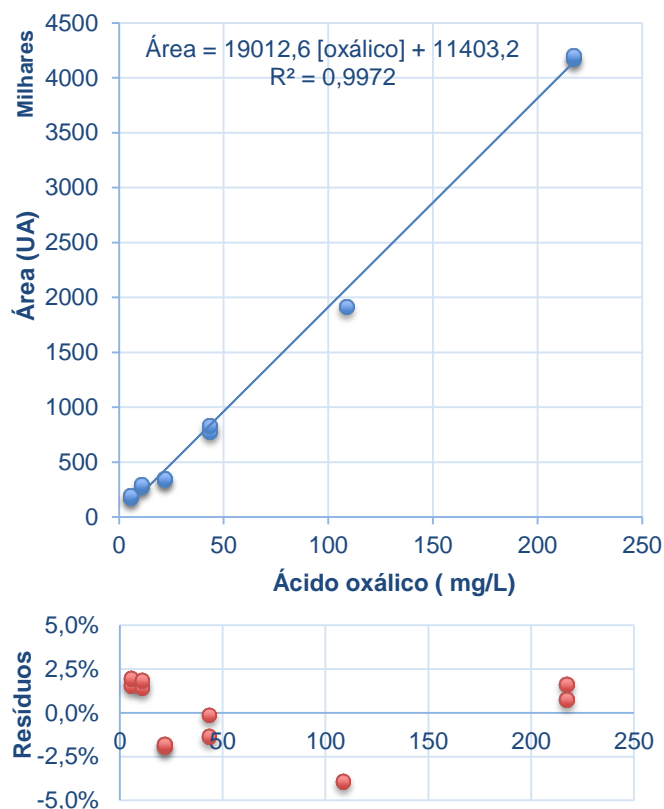


Figura A2.2.1 - Reta de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de ácido oxálico e respectivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.2.1 - Parâmetros de calibração linear do ácido oxálico.

Declive	19011,6 ± 335,8
Ordenada na origem	11403,2 ± 33756,1
R	0,9986
Desvio padrão dos resíduos	1,97%
LD (mg/L)	5,9
LQ (mg/L)	17,8
N	11
S_{y/x}	33756,1

b) Tartárico

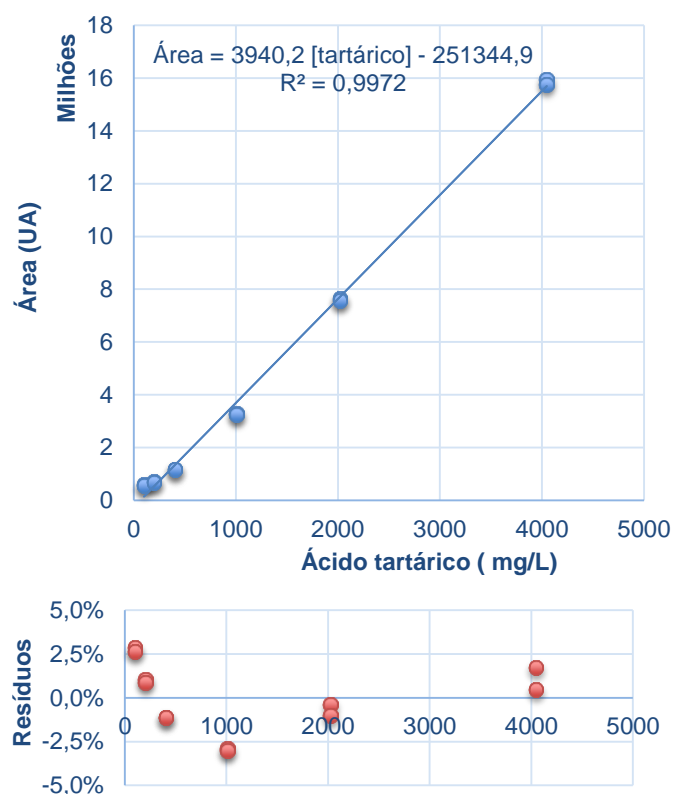


Figura A2.2.2 - Reta de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de ácido tartárico e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.2.2 - Parâmetros de calibração linear do ácido tartárico.

Declive	3940,2 ± 66,1
Ordenada na origem	-251344,9 ± 125709,7
R	0,9986
Desvio padrão dos resíduos	1,93%
LD (mg/L)	105,3
LQ (mg/L)	319,0
N	12
S_{y/x}	125709,7

b) Lático

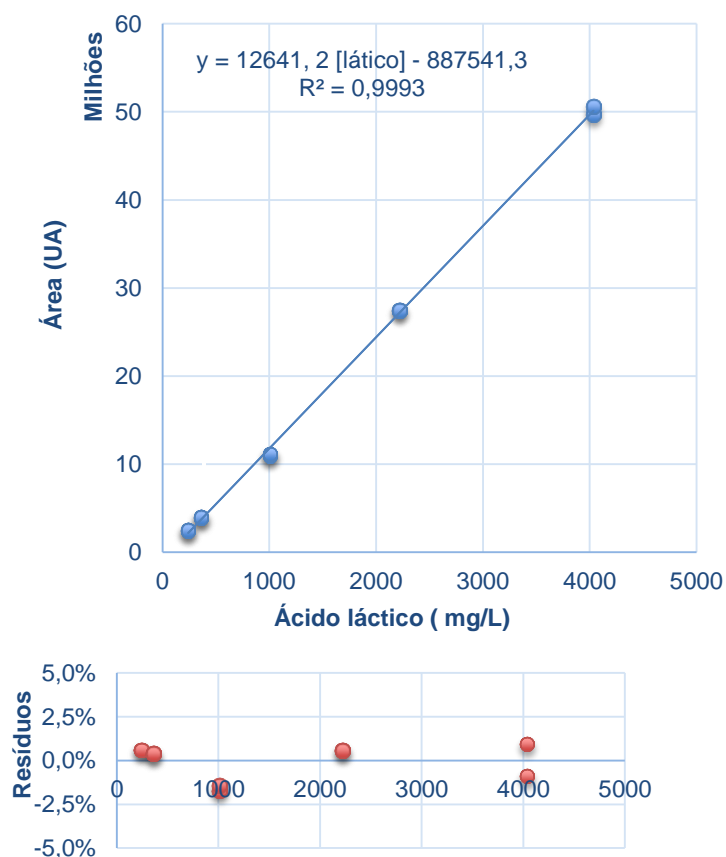


Figura A2.2.3 - Retas de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de ácido láctico e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.2.3 - Parâmetros de calibração linear do ácido láctico.

Declive	12641,2 ± 115,1
Ordenada na origem	-887541,3 ± 243696,8
R	0,9997
Desvio padrão dos resíduos	0,97%
LD (mg/L)	63,6
LQ (mg/L)	192,8
N	10
S_{y/x}	243696,8

d) Ascórbico

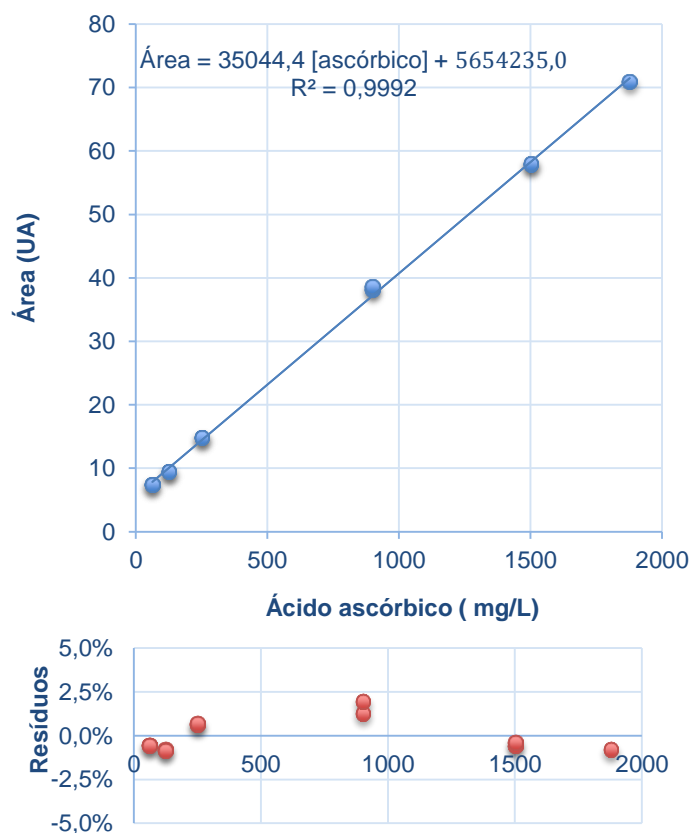


Figura A2.2.4 - Retas de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de ácido ascórbico e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.2.4 - Parâmetros de calibração linear do ácido ascórbico.

Declive	35044,4 ± 337,8
Ordenada na origem	5654235,0 ± 319300,3
R	0,9996
Desvio padrão dos resíduos	0,97%
LD (mg/L)	30,1
LQ (mg/L)	91,1
N	11
S_{y/x}	319300,3

e) Acético

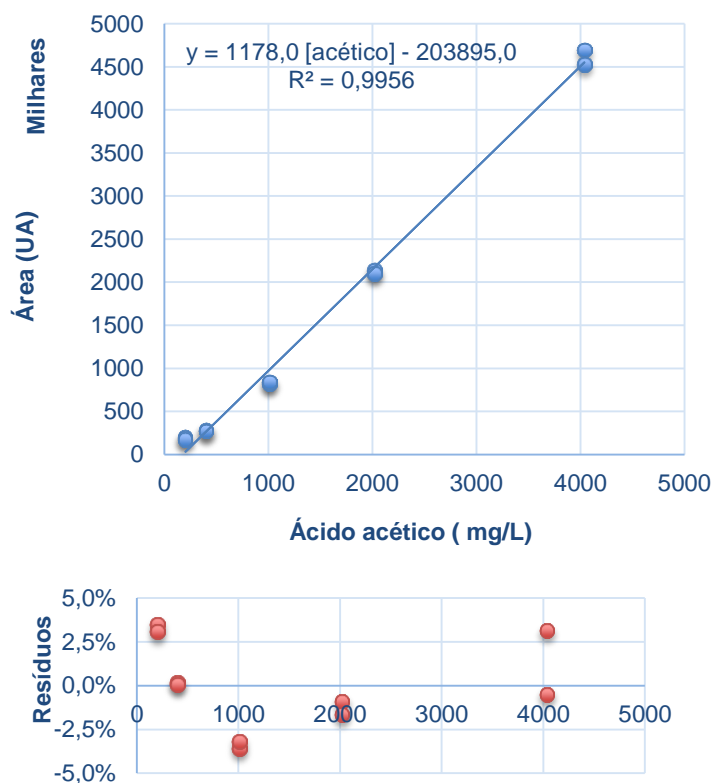


Figura A2.2.5 - Retas de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de ácido acético e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.2.5 - Parâmetros de calibração linear do ácido acético.

Declive	1178,0 ± 27,7
Ordenada na origem	-203895,0 ± 57613,5
R	0,9978
Desvio padrão dos resíduos	2,55%
LD (mg/L)	161,4
LQ (mg/L)	489,1
N	10
S_{y/x}	57613,5

f) Cítrico

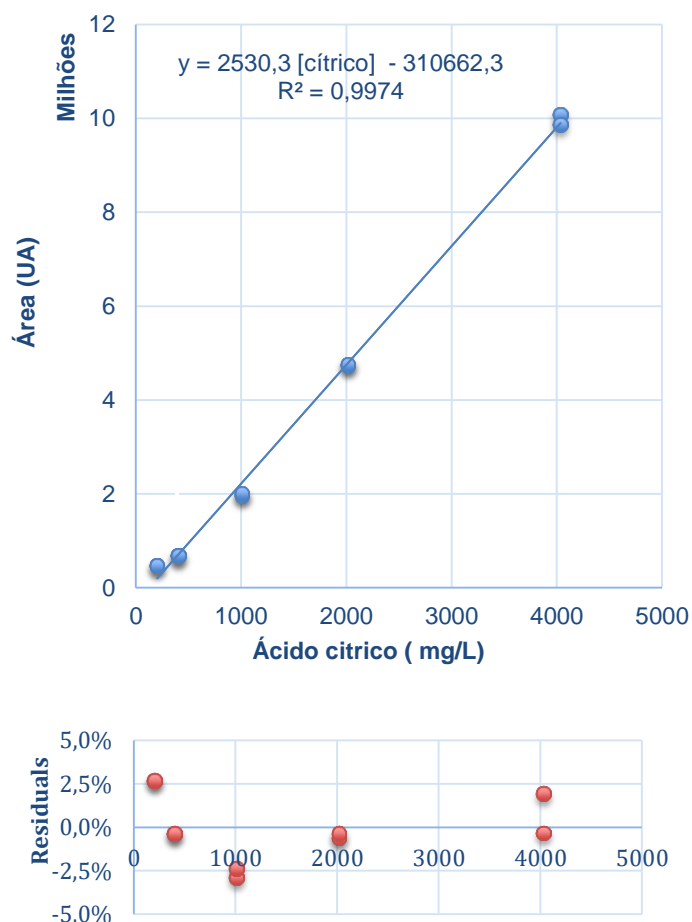


Figura A2.2.6 - Reta de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de ácido cítrico e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.2.6 - Parâmetros de calibração linear do ácido cítrico.

Declive	2530,3 ± 45,4
Ordenada na origem	-310662,3 ± 94271,0
R	0,9987
Desvio padrão dos resíduos	1,92%
LD (mg/L)	122,9
LQ (mg/L)	372,6
N	10
S_{y/x}	94271,0

g) Málico

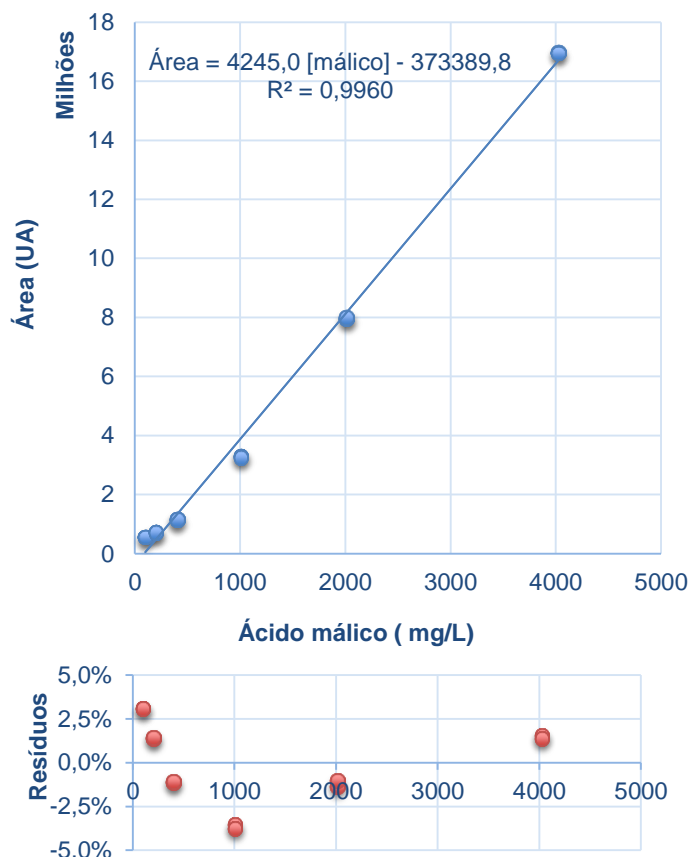


Figura A2.2.3 - Retas de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de ácido málico e respetivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.2.8 - Parâmetros de calibração linear do ácido málico.

Declive	4245,0 ± 85,0
Ordenada na origem	-373388,8 ± 160947,0
R	0,9980
Desvio padrão dos resíduos	2,32%
LD (mg/L)	125,1
LQ (mg/L)	379,2
N	12
S_{y/x}	160947,0

h) Propiônico

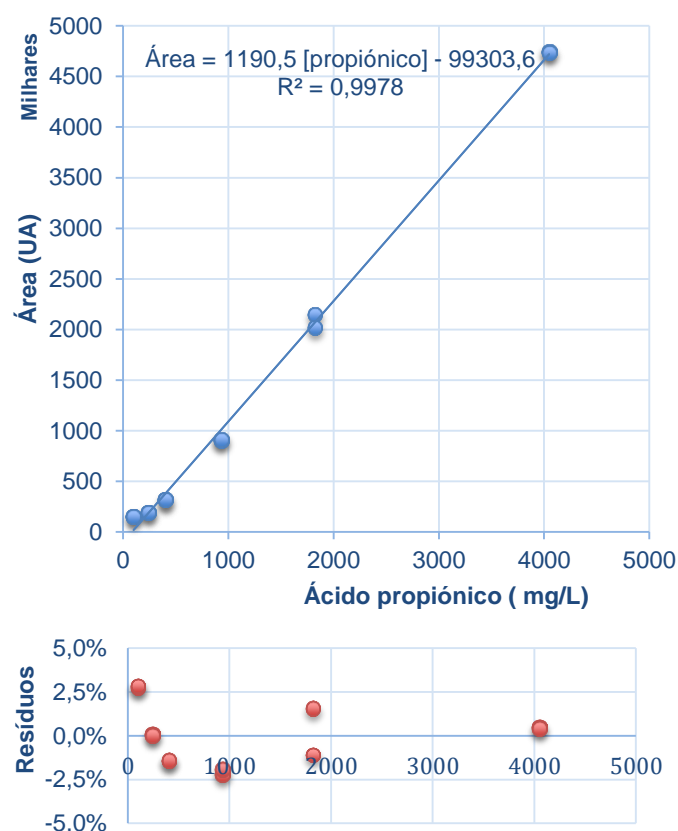


Figura A2.2.9 - Reta de calibração (área do pico vs concentração do analito) da solução padrão de ácido propiônico e respectivo mapa de resíduos (%), obtidos nos ensaios para a validação da gama de trabalho e linearidade.

Tabela A2.2.95- Parâmetros de calibração linear do ácido propiônico.

Declive	1190,5 ± 17,9
Ordenada na origem	-99303,6 ± 33249,5
R	0,9989
Desvio padrão dos resíduos	1,71%
LD (mg/L)	92,2
LQ (mg/L)	279,3
N	12
Sy/x	33249,5

Anexo 3 - Perfil dos analitos nos hortofrutícolas.

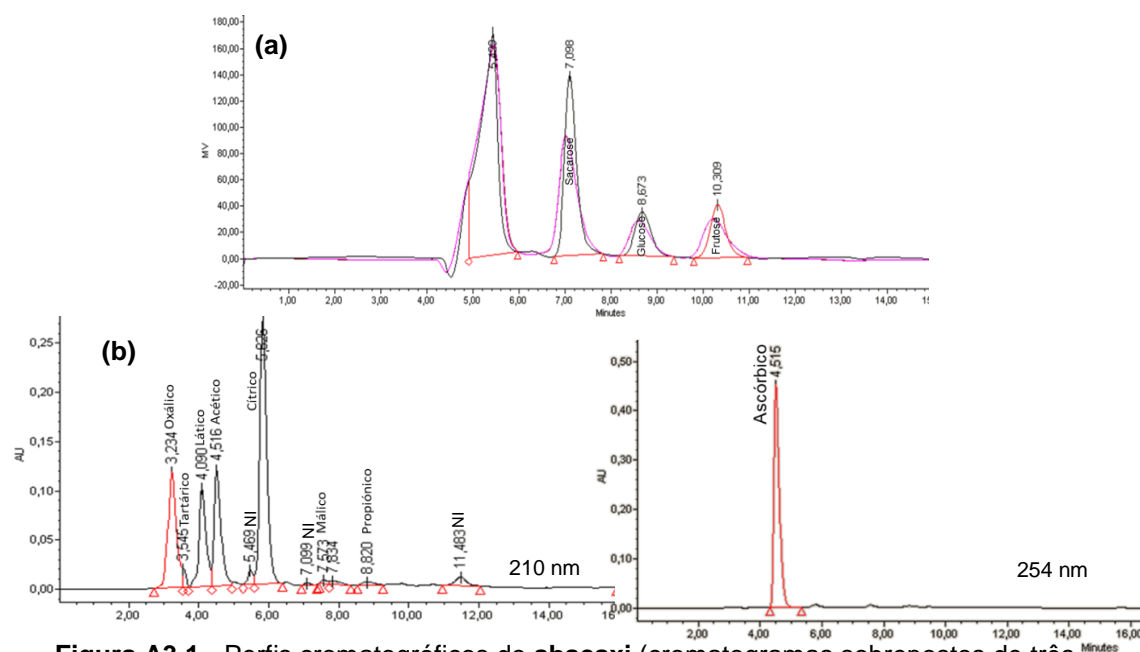


Figura A3.1 - Perfis cromatográficos do **abacaxi** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glucose ($t_r=8,7$ min) e frutose ($t_r=10,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=3,2$ min), tartárico ($t_r=3,5$ min), láctico ($t_r=4,1$ min), ascórbico ($t_r=4,5$ min), acético ($t_r=4,5$ min), cítrico ($t_r=5,8$ min), málico ($t_r=7,6$ min) e propiónico ($t_r=8,8$ min). Sendo NI - pico não identificado.

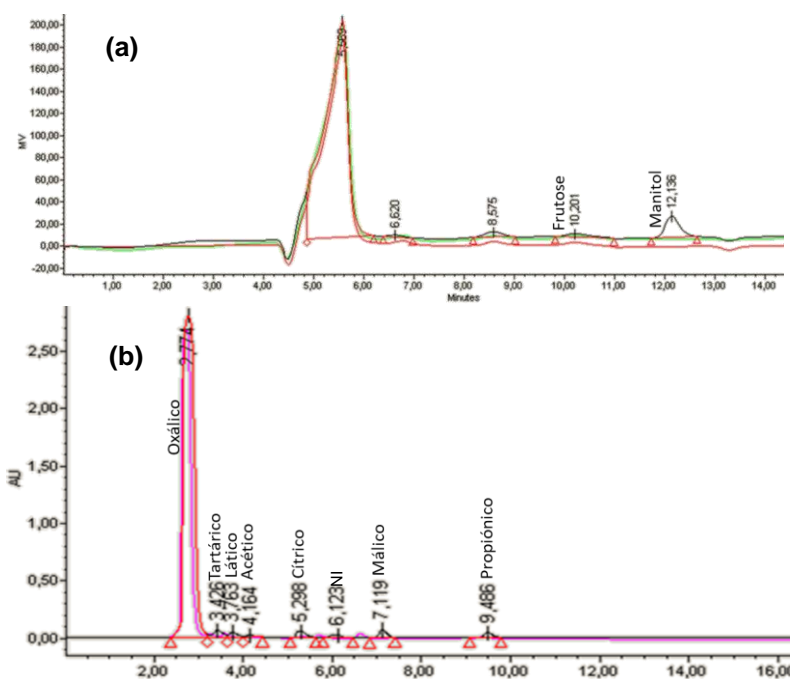


Figura A3.2 - Perfis cromatográficos da **alface** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: frutose ($t_r=10,2$ min) e manitol ($t_r=12,1$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,8$ min), tartárico ($t_r=3,4$ min), láctico ($t_r=3,8$ min), acético ($t_r=4,2$ min), cítrico ($t_r=5,3$ min), málico ($t_r=7,1$ min) e propiónico ($t_r=9,5$ min). Sendo NI - pico não identificado.

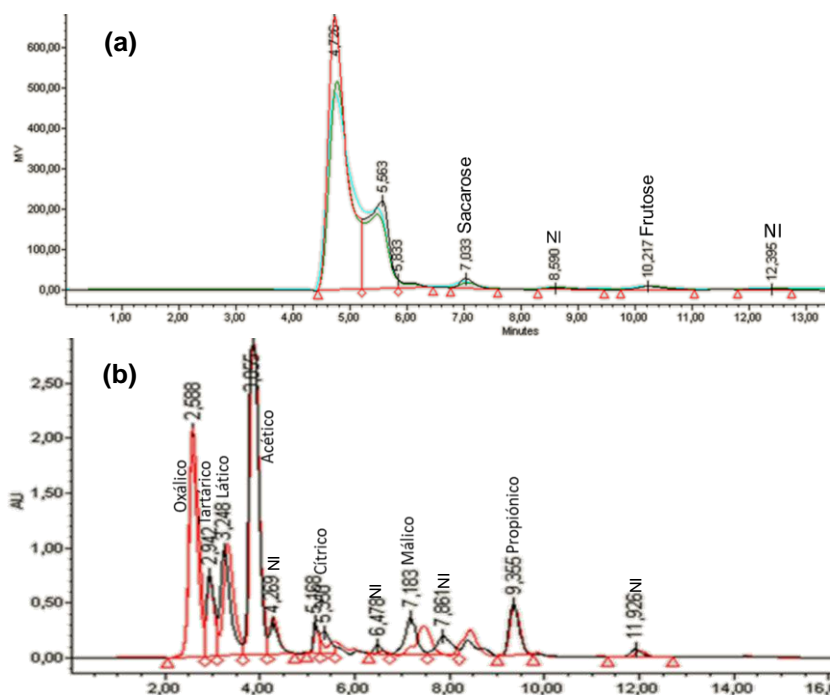


Figura A3.3 - Perfis cromatográficos do **alho** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,0$ min) e frutose ($t_r=10,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,6$ min), tartárico ($t_r=3,0$ min), láctico ($t_r=3,2$ min), acético ($t_r=4,0$ min), cítrico ($t_r=5,3$ min), málico ($t_r=7,2$ min) e propiónico ($t_r=9,4$ min). Sendo NI - pico não identificado.

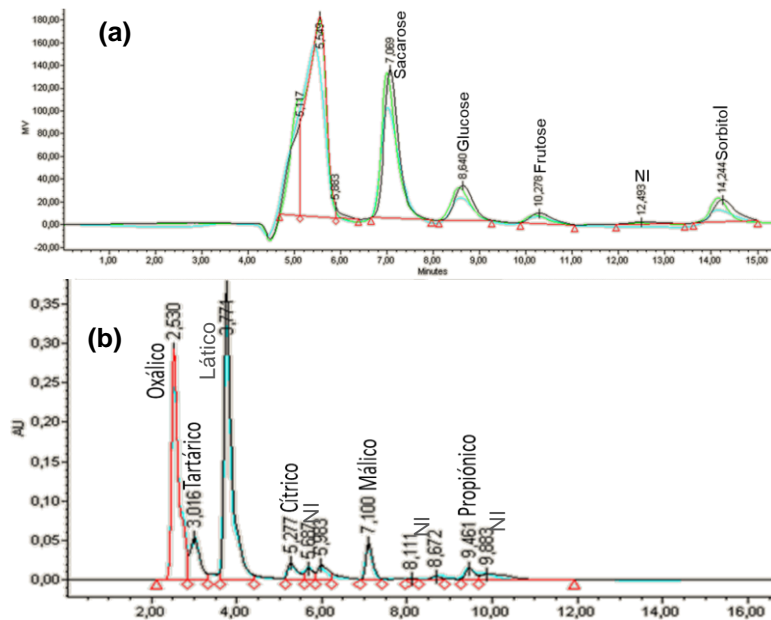


Figura A3.4 - Perfis cromatográficos do **alperce** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glucose ($t_r=8,6$ min), frutose ($t_r=10,3$ min) e sorbitol ($t_r=14,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=3,0$ min), Láctico ($t_r=3,7$ min), acético ($t_r=4,0$ min), cítrico ($t_r=5,3$ min), málico ($t_r=7,1$ min) e propiónico ($t_r=9,5$ min). Sendo NI - pico não identificado.

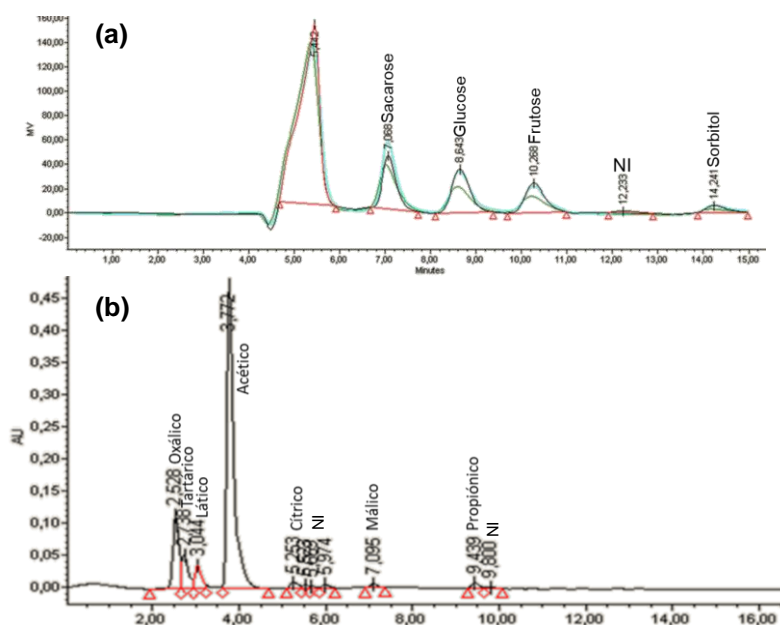


Figura A3.5 - Perfis cromatográficos da **ameixa amarela** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glucose ($t_r=8,6$ min), frutose ($t_r=10,3$ min) e sorbitol ($t_r=14,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), láctico ($t_r=3,0$ min), acético ($t_r=3,7$ min), cítrico ($t_r=5,3$ min), málico ($t_r=7,1$ min) e propiónico ($t_r=9,4$ min). Sendo NI - pico não identificado.

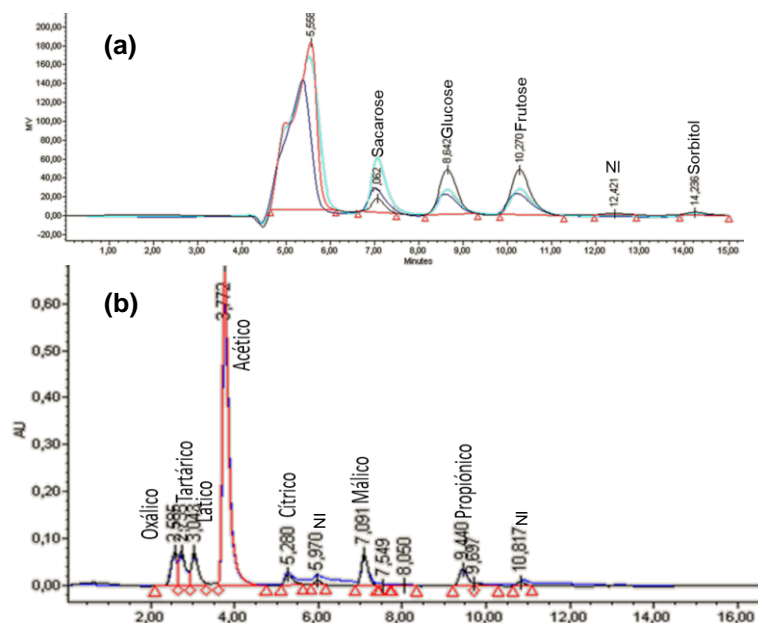


Figura A3.6 - Perfis cromatográficos da **ameixa vermelha** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glucose ($t_r=8,6$ min), frutose ($t_r=10,3$ min) e sorbitol ($t_r=14,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=3,6$ min), tartárico ($t_r=2,2$ min), láctico ($t_r=3,0$ min), acético ($t_r=3,7$ min), cítrico ($t_r=5,3$ min), málico ($t_r=7,1$ min) e propiónico ($t_r=9,4$ min). Sendo NI - pico não identificado.

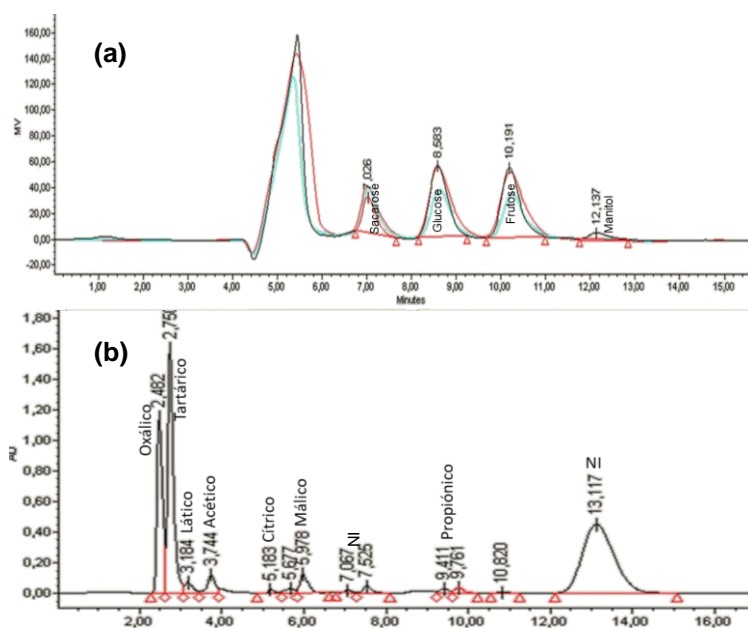


Figura A3.7 - Perfis cromatográficos da **banana** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). (a) Açúcares: sacarose ($t_r=7,0$ min), glucose ($t_r=8,6$ min), frutose ($t_r=10,2$ min) e manitol ($t_r=12,1$ min). (b) Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=2,8$ min), láctico ($t_r=3,2$ min), acético ($t_r=3,7$ min), cítrico ($t_r=5,2$ min), málico ($t_r=6,0$ min) e propiónico ($t_r=9,4$ min). Sendo NI - pico não identificado.

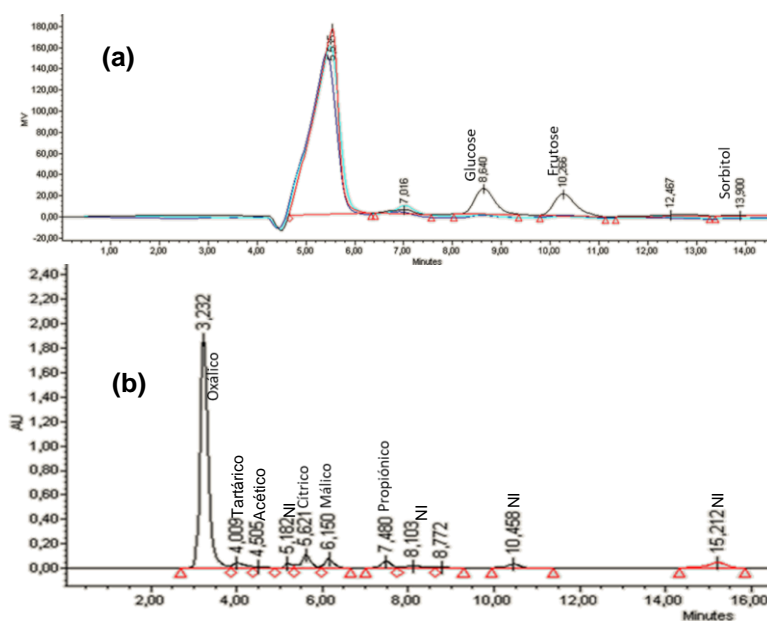


Figura A3.8 - Perfis cromatográficos da **batata** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). (a) Açúcares: glucose ($t_r=8,6$ min), frutose ($t_r=10,3$ min) e sorbitol ($t_r=13,9$ min). (b) Ácidos: oxálico ($t_r=3,2$ min), cítrico ($t_r=5,6$ min), málico ($t_r=6,2$ min) e propiónico ($t_r=7,4$ min). Sendo NI - pico não identificado.

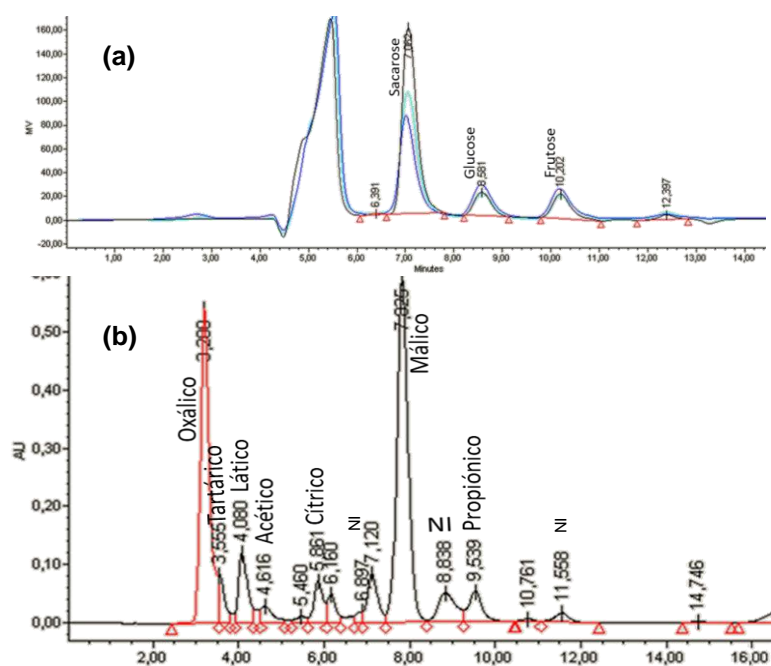


Figura A3.9 - Perfis cromatográficos da **batata doce** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glicose ($t_r=8,6$ min), frutose ($t_r=10,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=3,2$ min), tartárico ($t_r=3,6$ min), láctico ($t_r=4,1$ min), acético ($t_r=4,6$ min), cítrico ($t_r=5,8$ min), málico ($t_r=7,0$ min) e propiónico ($t_r=9,5$ min). Sendo NI - pico não identificado.

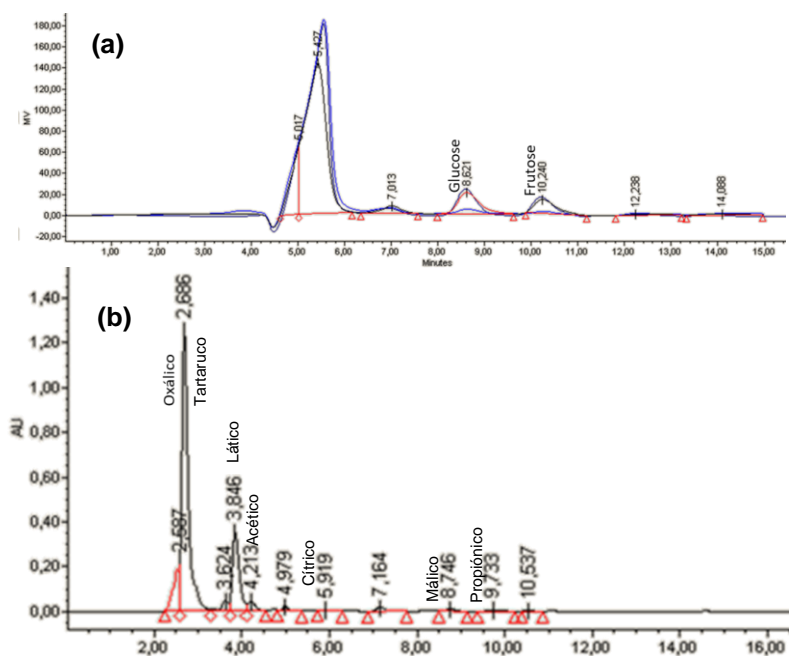


Figura A3.10 - Perfis cromatográficos da **beringela** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: glicose ($t_r=8,6$ min) e frutose ($t_r=10,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), láctico ($t_r=3,8$ min), acético ($t_r=3,8$ min), cítrico ($t_r=5,9$ min), málico ($t_r=8,7$ min) e propiónico ($t_r=9,7$ min). Sendo NI - pico não identificado.

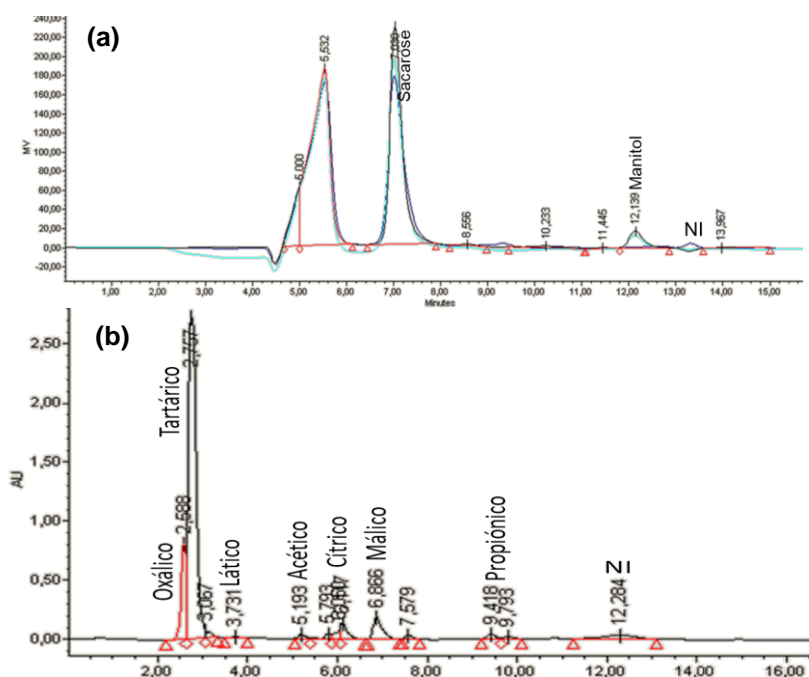


Figura A3.11 - Perfis cromatográficos da **beterraba** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,0$ min) e manitol ($t_r=12,1$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,6$ min), tartárico ($t_r=2,8$ min), láctico ($t_r=3,8$ min), acético ($t_r=5,2$ min), cítrico ($t_r=6,1$ min), málico ($t_r=6,9$ min) e propiónico ($t_r=9,4$ min). Sendo NI - pico não identificado.

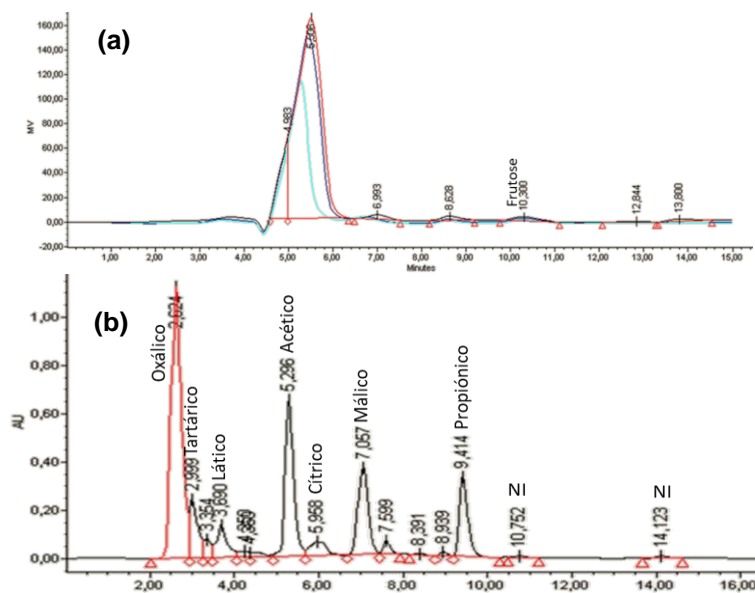


Figura A3.12 - Perfis cromatográficos dos **brócolos** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: frutose ($t_r=10,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,6$ min), tartárico ($t_r=3,0$ min), láctico ($t_r=3,7$ min), acético ($t_r=5,3$ min), cítrico ($t_r=6,0$ min), málico ($t_r=7,1$ min) e propiónico ($t_r=9,4$ min). Sendo NI – pico não identificado.

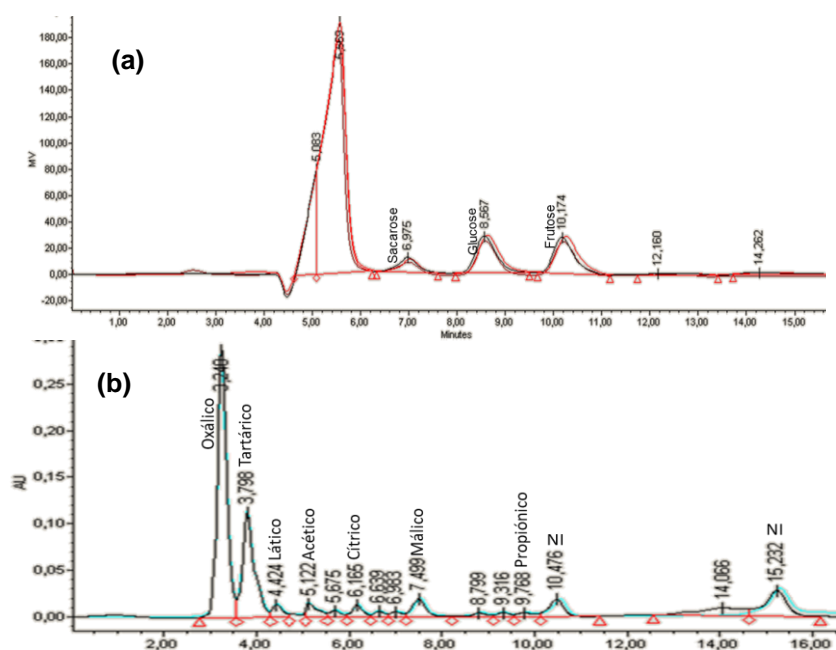


Figura A3.13 - Perfis cromatográficos da **cebola** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,0$ min), glicose ($t_r=8,6$ min) e frutose ($t_r=10,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=3,2$ min), tartárico ($t_r=3,8$ min), láctico ($t_r=4,4$ min), acético ($t_r=5,1$ min), cítrico ($t_r=6,2$ min), málico ($t_r=7,5$ min) e propiónico ($t_r=9,8$ min). Sendo NI – pico não identificado.

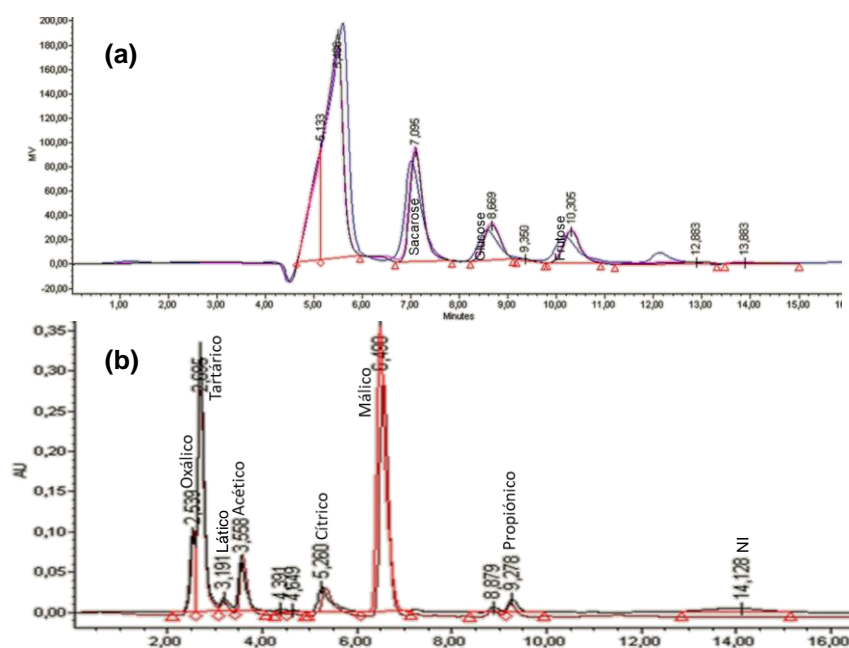


Figura A3.14 - Perfis cromatográficos da **cenoura** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glicose ($t_r=8,7$ min) e frutose ($t_r=10,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), láctico ($t_r=3,1$ min), acético ($t_r=3,5$ min), cítrico ($t_r=5,3$ min), málico ($t_r=6,5$ min) e propiónico ($t_r=9,3$ min). Sendo NI – pico não identificado.

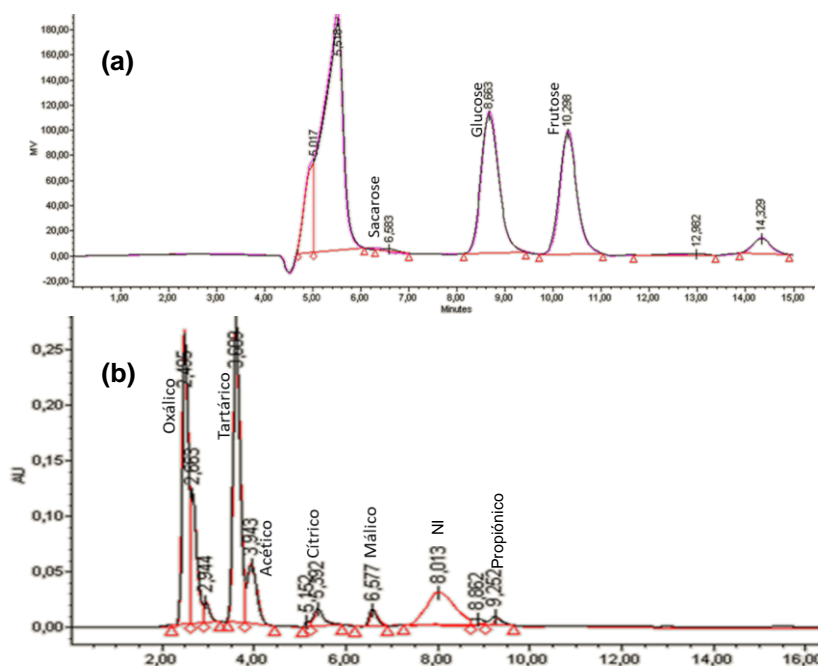


Figura A3.15 - Perfis cromatográficos da **cereja** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: glucose ($t_r=8,7$ min) e frutose ($t_r=10,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=3,6$ min), acético ($t_r=3,9$ min), cítrico ($t_r=5,4$ min), málico ($t_r=6,6$ min) e propiónico ($t_r=8,1$ min). Sendo NI – pico não identificado.

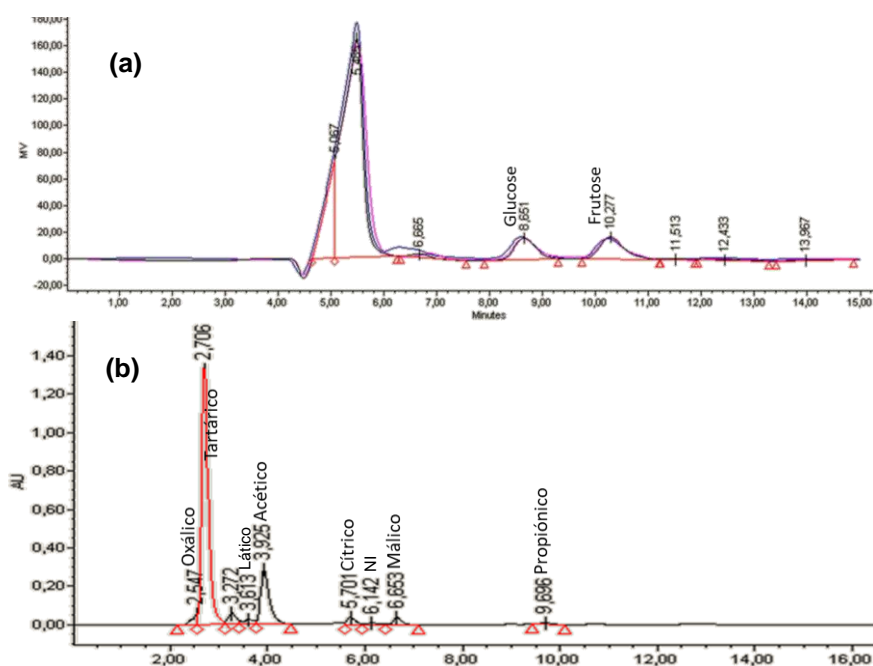


Figura A3.16 - Perfis cromatográficos do **chuchu** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: glucose ($t_r=8,6$ min) e frutose ($t_r=10,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), láctico ($t_r=3,6$ min), acético ($t_r=3,9$ min), cítrico ($t_r=5,7$ min), málico ($t_r=6,7$ min) e propiónico ($t_r=9,7$ min).

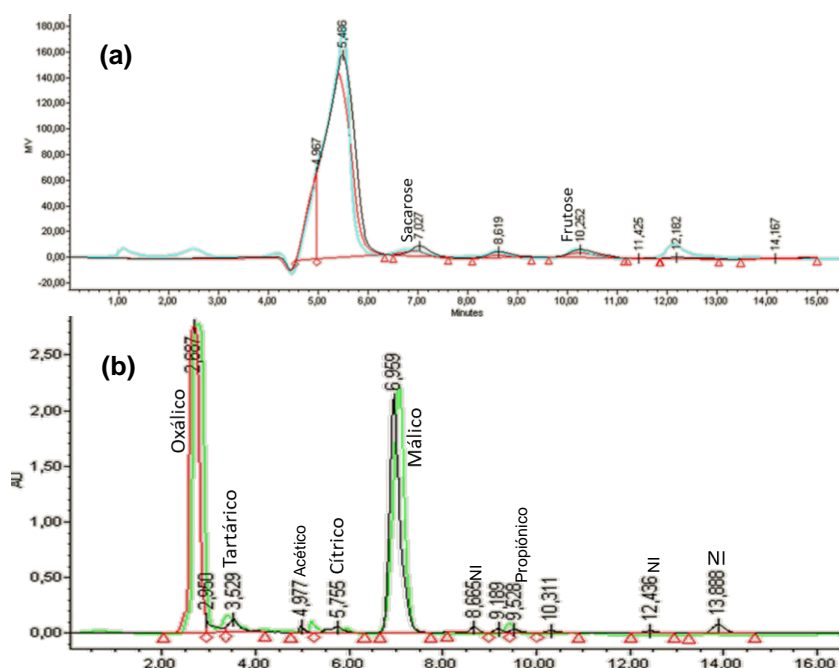


Figura A3.17 - Perfis cromatográficos dos **coentros** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,0$ min) e frutose ($t_r=10,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,7$ min), tartárico ($t_r=3,5$ min), acético ($t_r=5,0$ min), cítrico ($t_r=5,8$ min), málico ($t_r=7,0$ min) e propiónico ($t_r=9,5$ min). Sendo NI – pico não identificado.

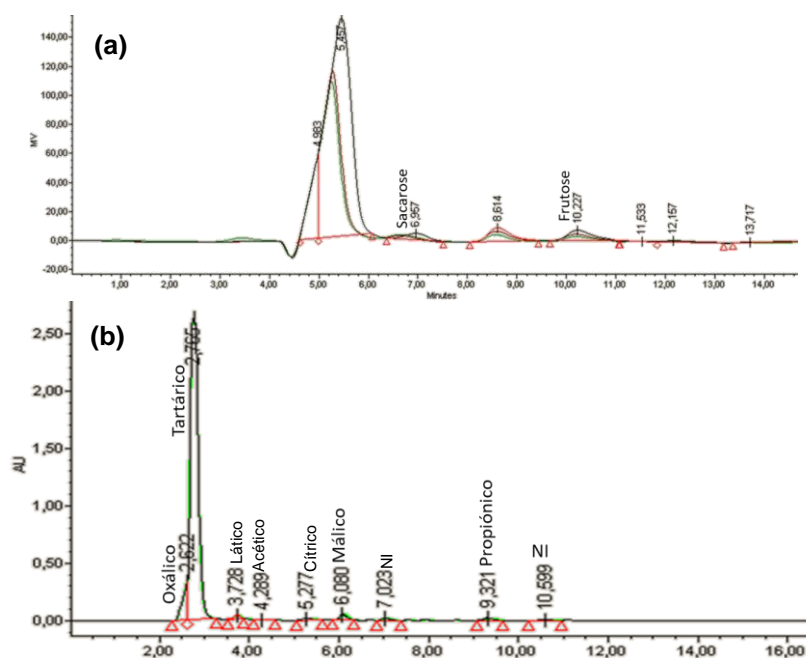


Figura A3.18 - Perfis cromatográficos da **couve portuguesa** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,0$ min) e frutose ($t_r=10,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,6$ min), tartárico ($t_r=2,8$ min), láctico ($t_r=3,7$ min), acético ($t_r=4,3$ min), cítrico ($t_r=5,3$ min), málico ($t_r=6,1$ min) e propiónico ($t_r=9,3$ min). Sendo NI – pico não identificado.

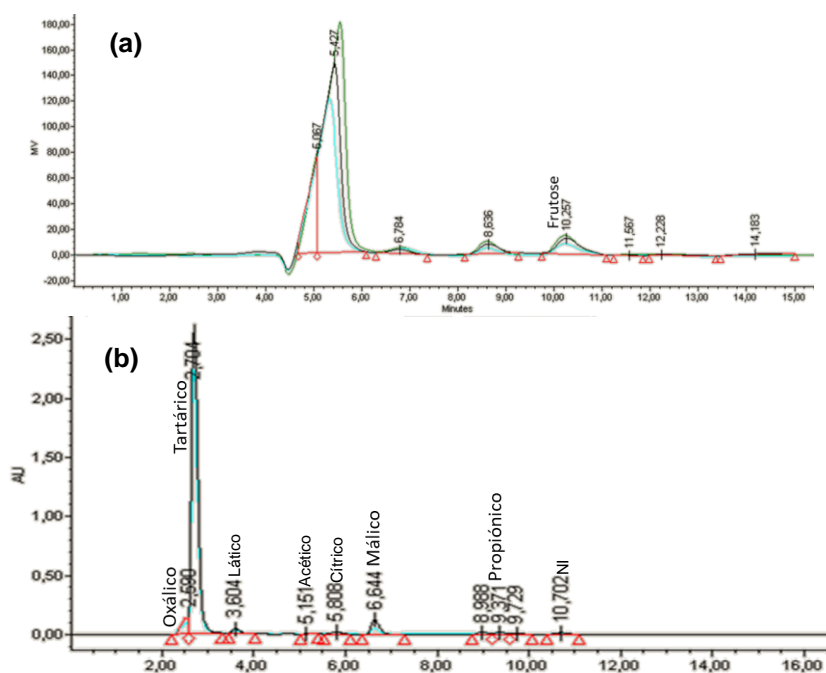


Figura A3.19 - Perfis cromatográficos da **curgete** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: frutose ($t_r=10,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,6$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), láctico ($t_r=3,6$ min), acético ($t_r=5,2$ min), cítrico ($t_r=5,8$ min), málico ($t_r=6,6$ min) e propiônico ($t_r=9,4$ min). Sendo NI – pico não identificado.

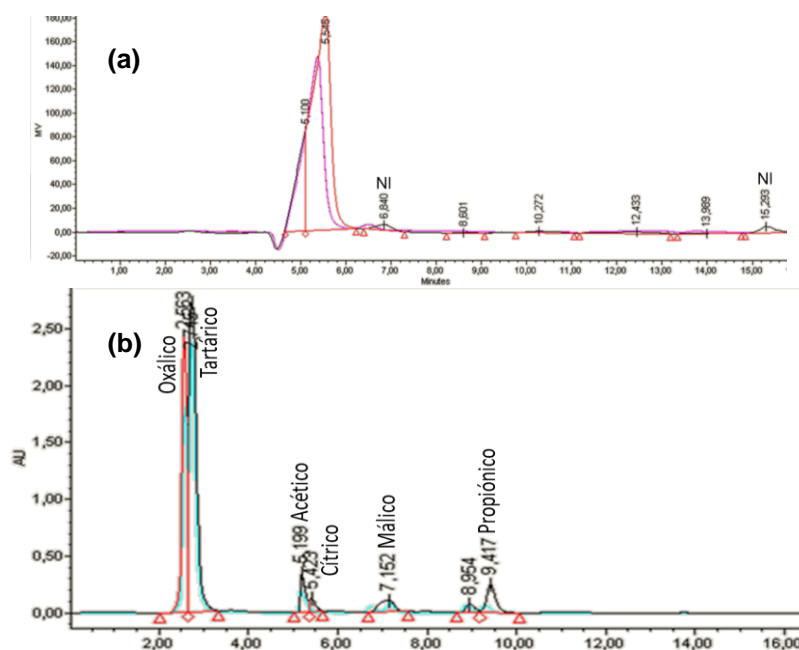


Figura A3.20 - Perfis cromatográficos do **espinafre** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares. **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), acético ($t_r=5,2$ min), cítrico ($t_r=5,4$ min), málico ($t_r=7,2$ min) e propiônico ($t_r=9,4$ min). Sendo NI - pico não identificado.

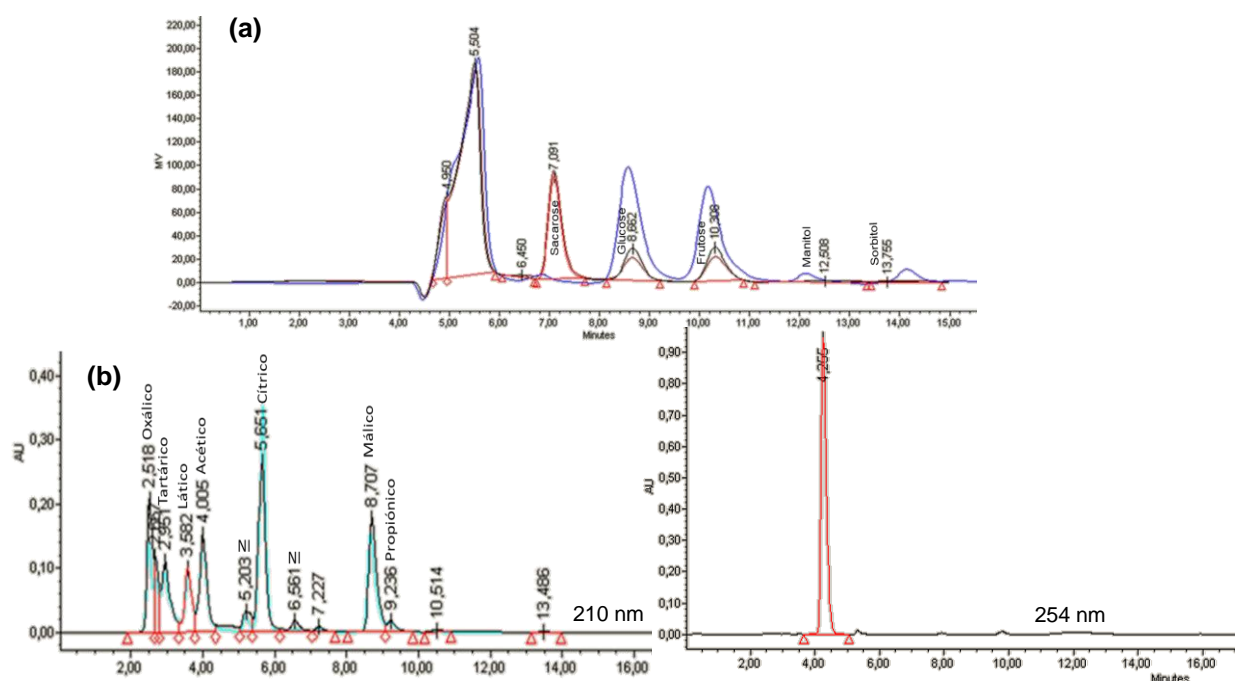


Figura A3.21 - Perfis cromatográficos da **laranja** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glucose ($t_r=8,7$ min), frutose ($t_r=10,3$ min), manitol ($t_r=12,5$ min) e sorbitol ($t_r=14,0$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=3,0$ min), láctico ($t_r=3,6$ min), ascórbico ($t_r=4,5$ min), acético ($t_r=4,0$ min), cítrico ($t_r=5,7$ min), málico ($t_r=8,7$ min) e propiónico ($t_r=9,2$ min). sendo NI – pico não identificado.

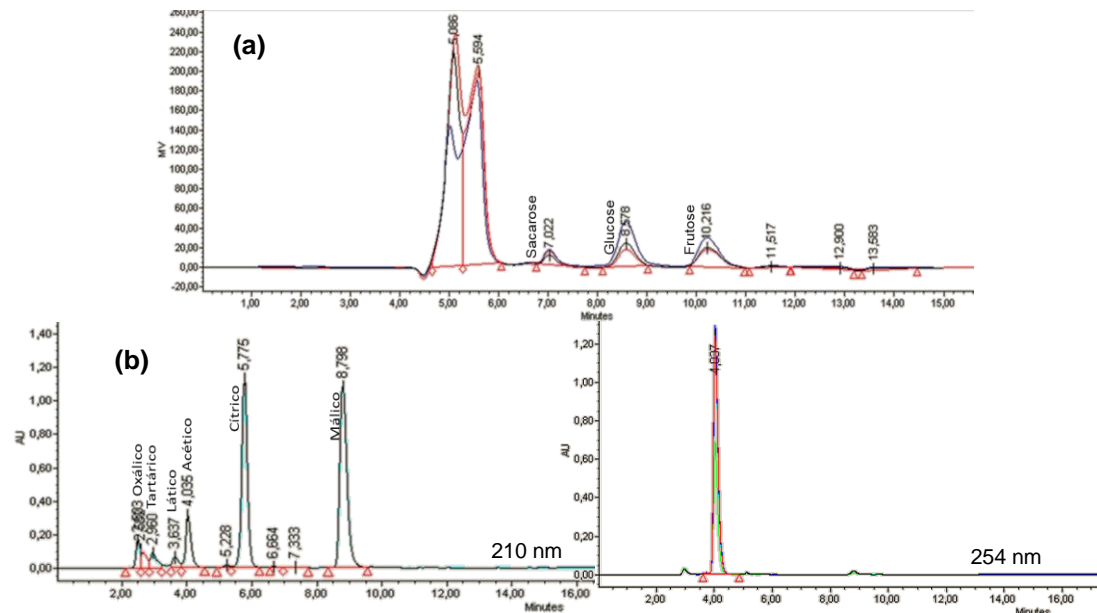


Figura A3.22 - Perfis cromatográficos do **limão** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,0$ min), glucose ($t_r=8,6$ min) e frutose ($t_r=10,2$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,6$ min), tartárico ($t_r=3,0$ min), láctico ($t_r=3,6$ min), ascórbico ($t_r=4,5$ min), acético ($t_r=4,0$ min), cítrico ($t_r=5,8$ min) e málico ($t_r=8,8$ min).

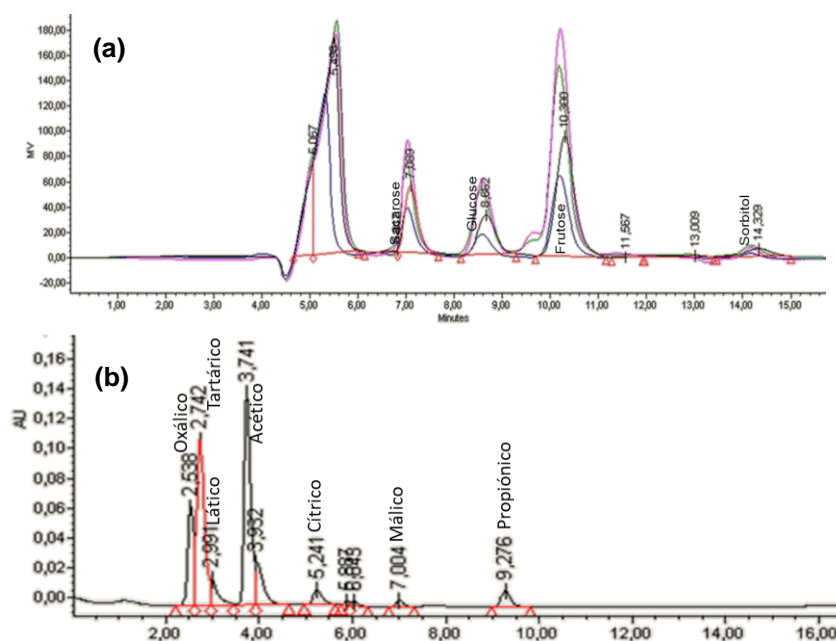


Figura A3.23 - Perfis cromatográficos da **maçã alcobaça** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,0$ min), glucose ($t_r=8,7$ min), frutose ($t_r=10,3$ min) e sorbitol ($t_r=14,0$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), láctico ($t_r=3,0$ min), acético ($t_r=3,7$ min), cítrico ($t_r=5,2$ min), málico ($t_r=7,0$ min) e propiónico ($t_r=9,3$ min).

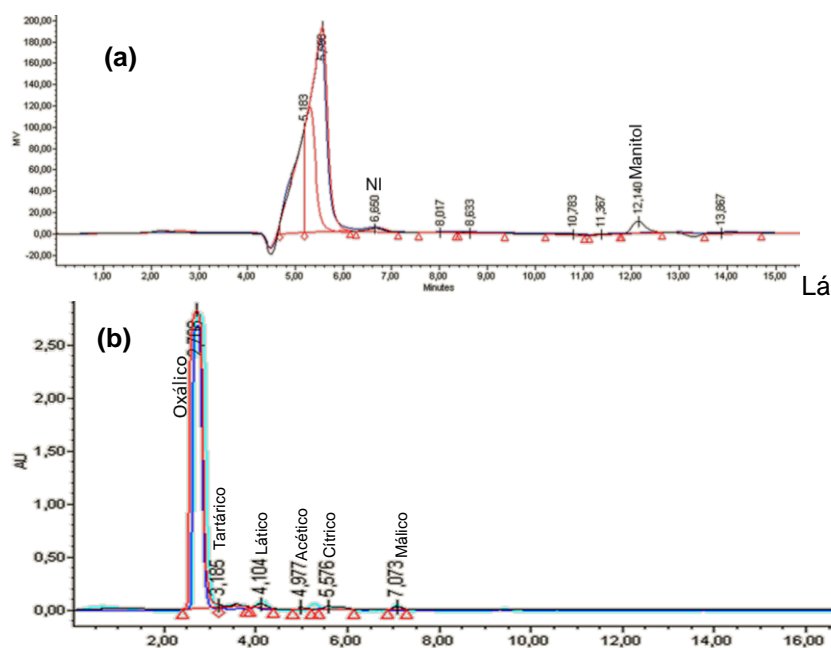


Figura A3.24 - Perfis cromatográficos do **manjeriço** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: manitol ($t_r=12,1$ min). **(b)** Ácido: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=3,2$ min), láctico ($t_r=4,1$ min), acético ($t_r=4,9$ min), cítrico ($t_r=5,6$ min) e málico ($t_r=7,1$ min). sendo NI - pico não identificado.

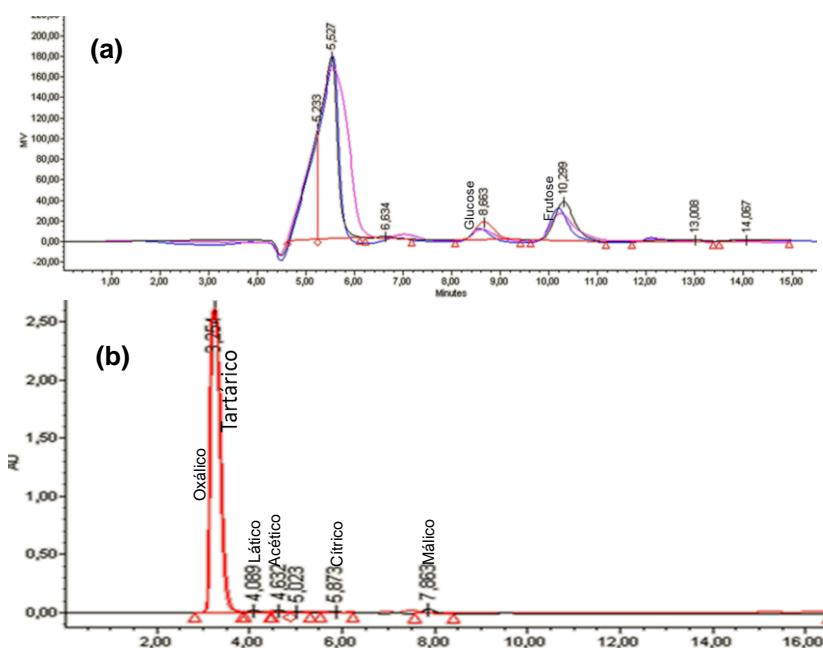


Figura A3.25 - Perfis cromatográficos da **melancia** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: glucose ($t_r=8,6$ min) e frutose ($t_r=10,3$ min). **(b)** Ácido: oxálico ($t_r=3,0$ min), tartárico ($t_r=3,3$ min), láctico ($t_r=4,1$ min), acético ($t_r=4,6$ min), cítrico ($t_r=6,0$ min) e málico ($t_r=8,0$ min).

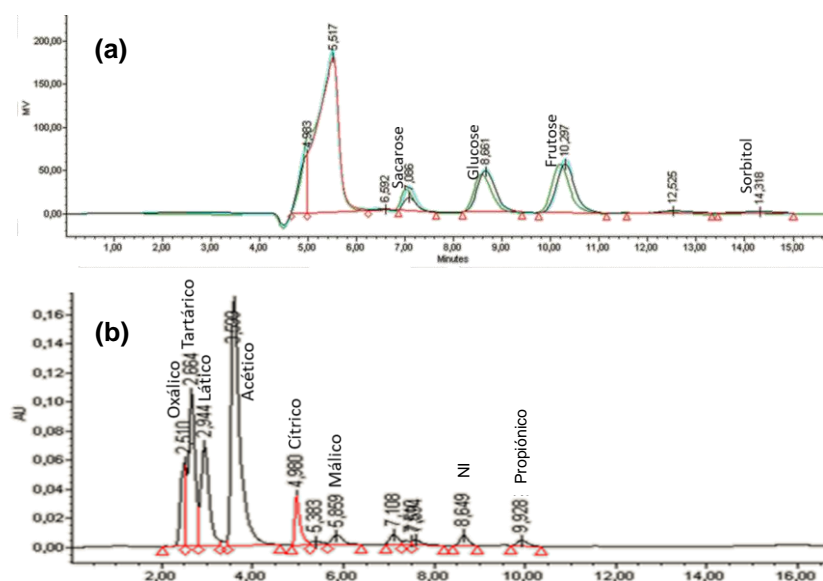


Figura A3.26 - Perfis cromatográficos da **nêspera** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glucose ($t_r=8,7$ min), frutose ($t_r=10,3$ min) e sorbitol ($t_r=14,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), láctico ($t_r=2,9$ min), acético ($t_r=3,0$ min), cítrico ($t_r=5,0$ min), málico ($t_r=5,9$ min) e propiónico ($t_r=9,9$ min). sendo NI – pico não identificado.

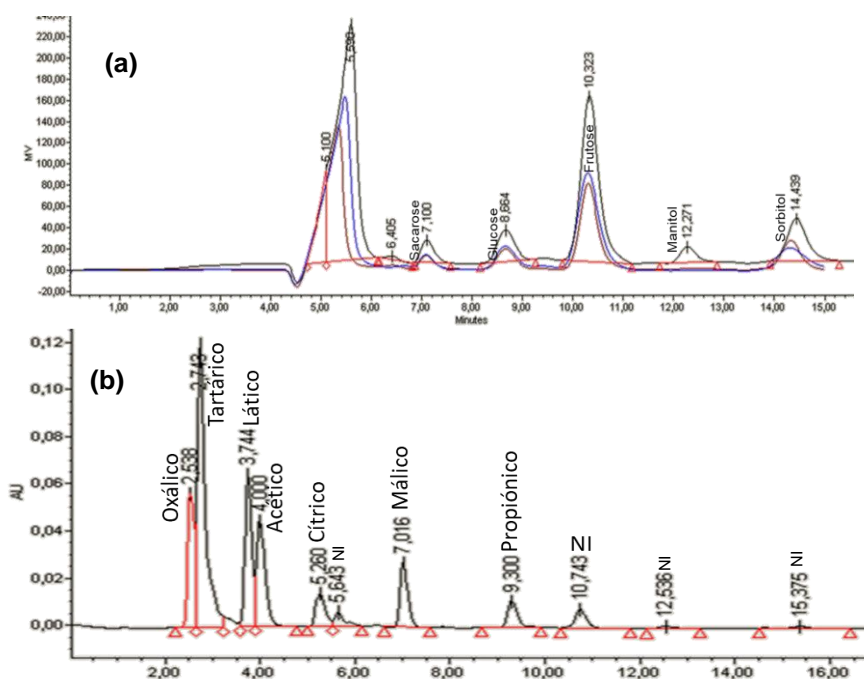


Figura A3.27 - Perfis cromatográficos da **pera rocha** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glucose ($t_r=8,7$ min), frutose ($t_r=10,3$ min), manitol ($t_r=12,3$ min) e sorbitol ($t_r=14,4$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), láctico ($t_r=3,7$ min), acético ($t_r=4,0$ min), cítrico ($t_r=5,3$ min), málico ($t_r=7,0$ min) e propiónico ($t_r=9,3$ min); sendo NI – pico não identificado.

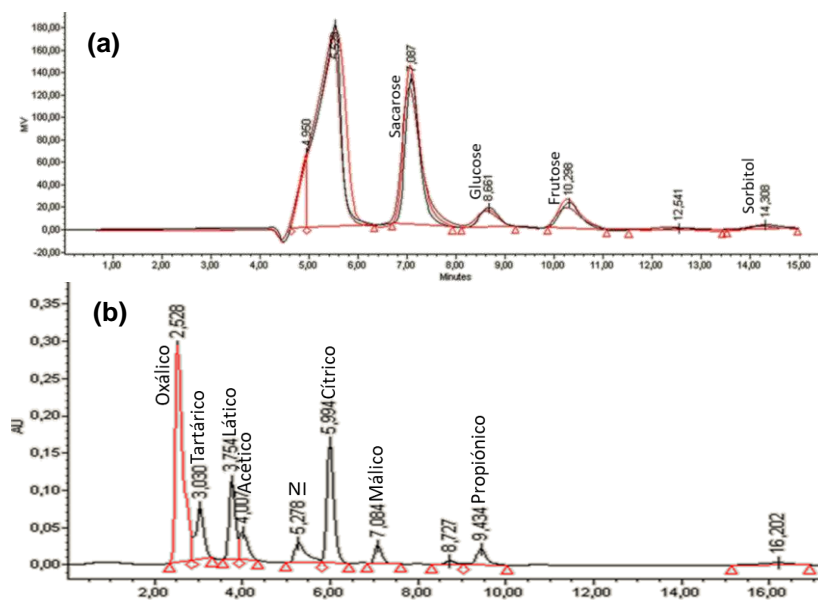


Figura A3.28 - Perfis cromatográficos do **pêssego** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: sacarose ($t_r=7,1$ min), glucose ($t_r=8,7$ min), frutose ($t_r=10,3$ min) e sorbitol ($t_r=14,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,5$ min), tartárico ($t_r=3,0$ min), láctico ($t_r=3,8$ min), acético ($t_r=4,0$ min), cítrico ($t_r=6,0$ min), málico ($t_r=7,1$ min) e propiónico ($t_r=9,4$ min). sendo NI – pico não identificado.

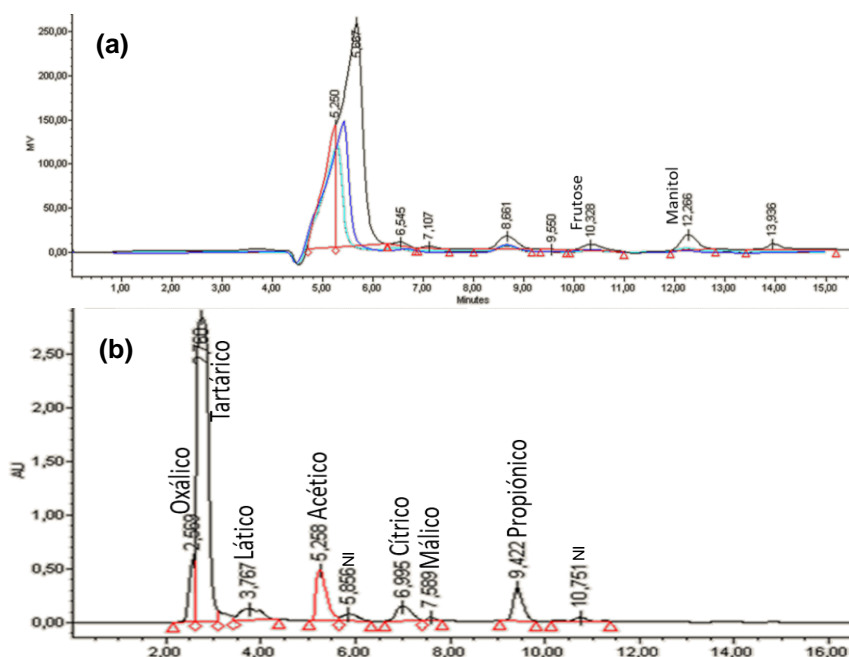


Figura A3.29 - Perfis cromatográficos da **salsa** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: frutose ($t_r=10,3$ min) e manitol ($t_r=12,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=2,6$ min), tartárico ($t_r=2,7$ min), láctico ($t_r=3,8$ min), acético ($t_r=5,3$ min), cítrico ($t_r=7,0$ min), málico ($t_r=7,6$ min) e propiónico ($t_r=9,4$ min). sendo NI – pico não identificado.

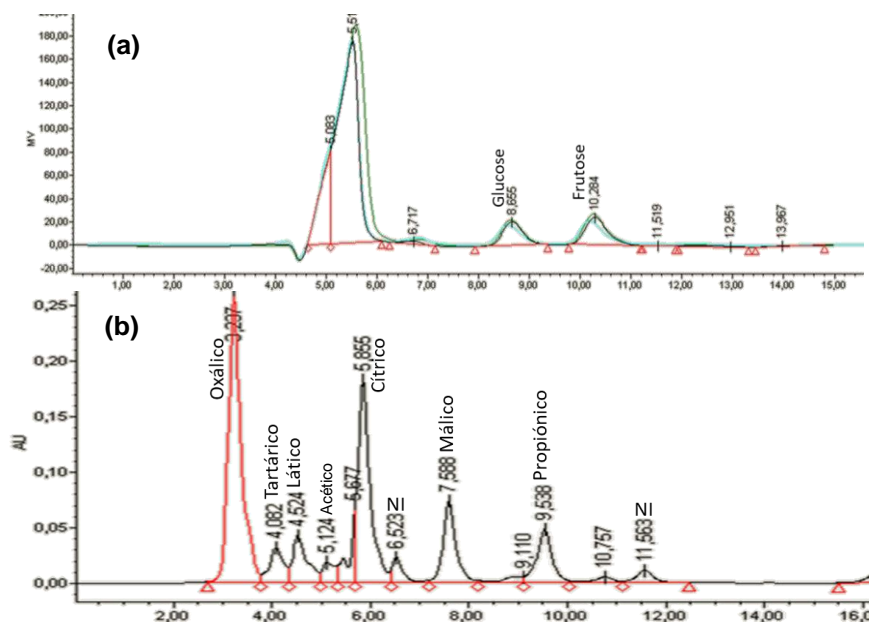


Figura A3.30 - Perfis cromatográficos do **tomate** (cromatogramas sobrepostos de três extrações independentes). **(a)** Açúcares: glucose ($t_r=8,6$ min) e frutose ($t_r=10,3$ min). **(b)** Ácidos: oxálico ($t_r=3,3$ min), tartárico ($t_r=4,1$ min), láctico ($t_r=4,5$ min), acético ($t_r=5,1$ min), cítrico ($t_r=5,9$ min), málico ($t_r=7,6$ min) e propiónico ($t_r=9,5$ min). sendo NI – pico não identificado.

Anexo 4 - Folha de cálculo do teste da homogeneidade das variâncias

A4.1. Açúcares

Tabela A4.1.1 - Homogeneidade das variâncias (exemplo para a sacarose) e cálculo do PG.

Sacarose	Conc.	Sinal (y _{ij} = Área do pico i; ensaio j)									
i	x _i (g/L)	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	1,00	1724205	1725600	1727962	1734255	1741234	1747598	1747844	1758103	1767454	1506283
2											
3											
4											
5											
6	30,03	44918766	45273353	45336346	44987783	44999471	45194417	45210274	45247095	45298710	45302280

Média de y ₁ =	1718053,8
Desvio padrão y ₁ =	75751,3
CV% y ₁ =	4,41
Variância y ₁ =	5738251229

Média de y ₆ =	45176849,5
Desvio padrão y ₆ =	151111,24
CV% y ₆ =	0,33
Variância y ₆ =	22834606889

$$S_i^2 = \frac{\sum_j^N |y_{i,j} - \bar{y}_i|^2}{n_i - 1}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_j^N y_{i,j}}{n_i}$$

$$F_{(n_{10}-1, n_{10}-1, 99\%)} = 5,35$$

Variância y ₆ > Variância y ₁ PG = 3.979

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad \text{se} \quad S_{10}^2 > S_1^2$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad \text{se} \quad S_1^2 > S_{10}^2$$

PG < F	OK
--------	----

Tabela A4.1.2 - Sinal (área do pico) das 10 réplicas relativas às concentrações extremas da gama de trabalho em estudo e respetiva variância (S_i^2).

N	Sinal (Área do pico)							
	Sacarose		Glucose		Frutose		Sorbitol	
	1,00 g/L	30,03 g/L	1,00 g/L	30,12 g/L	1,00 g/L	30,01 g/L	1,00 g/L	30,04 g/L
1	1724205	45273353	1684132	41150341	1718014	46976175	184173	40697481
2	1725600	45336346	1687909	41872724	1738570	46801372	1783832	40795744
3	1727962	44918766	1688500	41389437	1751675	46864109	1789358	42336912
4	1734255	44987783	1713659	41492394	1773679	46621524	1850116	43167150
5	1741234	44999471	1716859	41082304	1774797	46725897	1857607	43269906
6	1747598	45194417	1728544	41548880	1786239	47787924	1859196	43305390
7	1747844	45210274	1745834	42363488	1788229	47959922	1880436	43426518
8	1758103	45247095	1201859	42475574	1797469	47098493	1887502	43727708
9	1767454	45298710	1203551	42511426	1977479	46982604	1920754	44400533
10	1506283	45302280	1204347	41624184	1220948	47054759	2000614	43455287
S_i^2	$5,74 \times 10^9$	$2,28 \times 10^{10}$	$6,01 \times 10^{10}$	$2,84 \times 10^{11}$	$3,73 \times 10^{10}$	$1,95 \times 10^{11}$	$2,88 \times 10^{11}$	$1,50 \times 10^{12}$

A4.2. Ácidos orgânicos

Tabela A4.2.1 - Homogeneidade das variâncias (exemplo para o ácido cítrico) e cálculo do PG.

Cítrico	Conc.	Sinal (y _{ij} = Área do pico i; ensaio j)									
		ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	xi (g/L)										
1	101										
2	202	463862,3	467687,8	463565,5	464805,5	410352,5	411063,5	416197,5	420334,5	478754,5	411096,5
3											
4											
5											
6	4035	10090145	9866958	10056261	10046781	9990126	9981321	1,00E+07	9921546	9964561	10021431

Média de y ₂ =	440772
Desvio padrão y ₂ =	28882
CV% y ₂ =	6,6
Variância y ₂ =	834179947

Média de y ₆ =	9993628
Desvio padrão y ₆ =	65911,37
CV% y ₆ =	0,7
Variância y ₆ =	4344308114

$$S_i^2 = \frac{\sum_j^N |y_{i,j} - \bar{y}_i|^2}{n_i - 1}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_j^N y_{i,j}}{n_i}$$

$$F_{(n_{10}-1, n_1-1, 99\%)} = 5,35$$

$$\text{Variância } y_6 > \text{Variância } y_2$$

$$PG = 5,21$$

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad \text{se} \quad S_{10}^2 > S_1^2$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad \text{se} \quad S_1^2 > S_{10}^2$$

$$PG < F \quad \text{OK (para o segundo)}$$

Tabela A4.2.2 - Sinal obtido (áreas) das 10 réplicas referentes às concentrações do primeiro/segundo e último padrão da gama de trabalho em estudo e respetiva variância (S_i^2).

N	Sinal (Área do pico)					
	Oxálico		Tartárico		Lático	
	5,43 mg/L	217 mg/L	101 mg/L	4047 mg/L	242 mg/L	4035 mg/L
1	195154	4172536	593203	15962099	1724205	44918766
2	179301	4207271	557208	15763427	1725600	45273353
3	159678	4126578	546136	15862942	1727962	45336346
4	175514	4167468	558666	15862234	1734255	44987783
5	192972	4149753	594606	15862984	1741234	44999471
6	191780	4193313	540746	15863211	1747598	45194417
7	226786	4213918	592866	15862249	1747844	45210274
8	159610	4283958	559836	15862464	1758103	45247095
9	173994	4103588	561676	15862429	1767454	45298710
10	225240	4242413	546341	15862369	1506283	45302280
S_i^2	$5,57 \times 10^8$	$2,91 \times 10^9$	$4,31 \times 10^8$	$2,19 \times 10^9$	$5,74 \times 10^9$	$2,28 \times 10^{10}$

N	Sinal (Área do pico)					
	Ascórbico		Acético		Cítrico	
	63 mg/L	1878 mg/L	202 mg/L	4037 mg/L	202 mg/L	4035 mg/L
1	7401623	70887817	1724205	44918766	463862	10090145
2	7426829	69378574	1725600	45273353	467688	9866958
3	7242418	70133656	1727962	45336346	463566	10056261
4	7659984	70133370	1734255	44987783	464806	10046781
5	7467541	70133109	1741234	44999471	410353	9990126
6	7528300	70132719	1747598	45194417	411064	9981321
7	7598501	70133310	1747844	45210274	416198	9997146
8	7200936	70133370	1758103	45247095	420335	9921546
9	7409081	70133070	1767454	45298710	478755	9964561
10	7632691	70133578	1506283	45302280	411097	10021431
S_i^2	$2,39 \times 10^{10}$	$1,27 \times 10^{11}$	$5,74 \times 10^9$	$2,28 \times 10^{10}$	$8,34 \times 10^8$	$4,34 \times 10^9$

N	Sinal (Área do pico)			
	Málico		Propiónico	
	101 mg/L	4027 mg/L	101 mg/L	4049 mg/L
1	567989	16980850	150720	4744243
2	569942	16955128	154860	4739287
3	637745	17084759	145546	4750743
4	632309	16898309	152111	4726308
5	587885	16980524	156642	4751823
6	553125	17042689	156378	4736126
7	600145	16905409	148910	4733592
8	597405	17025154	147200	4727468
9	607845	17034354	158515	4745714
10	580245	17058949	159111	4759963
S_i^2	$7,52 \times 10^8$	$4,03 \times 10^9$	$2,31 \times 10^7$	$1,20 \times 10^8$

Anexo 5 - Folha de cálculo para o teste de linearidade (Teste de Mandel)

A5.1. Açúcares

Tabela A5.1 - Teste de linearidade de Mandel para a sacarose.

I (Sacarose)	x_i (g/L)	y_i (UA)	\hat{y}_i linear	\hat{y}_i polinomial	Ajuste linear $(y_i - \hat{y}_i)^2$	Ajuste polinomial $(y_i - \hat{y}_i)^2$
1	1,00	1688682	1349415,0	1454736,4	$1,15 \times 10^{11}$	$5,47 \times 10^{10}$
2	1,00	1724205	1349415,0	1454736,4	$1,40 \times 10^{11}$	$7,26 \times 10^{10}$
3	1,00	1725600	1349415,0	1454736,4	$1,42 \times 10^{11}$	$7,34 \times 10^{10}$
4	5,00	7784015	5352865,0	5485987,7	$5,91 \times 10^{12}$	$5,28 \times 10^{12}$
5	5,00	8238409	5352865,0	5485987,7	$8,33 \times 10^{12}$	$7,58 \times 10^{12}$
6	5,00	8310764	5352865,0	5485987,7	$8,75 \times 10^{12}$	$7,98 \times 10^{12}$
7	10,00	14603432	10357065,0	10577064,7	$1,80 \times 10^{13}$	$1,62 \times 10^{13}$
8	20,02	29716664	20365565,0	20933074,7	$8,74 \times 10^{13}$	$7,72 \times 10^{13}$
9	20,02	29716664	20365565,0	20933074,7	$8,74 \times 10^{13}$	$7,72 \times 10^{13}$
10	25,02	37891435	25369865,0	26198010,1	$1,57 \times 10^{14}$	$1,37 \times 10^{14}$
11	30,02	44918766	30374065,0	31520758,0	$2,12 \times 10^{14}$	$1,79 \times 10^{14}$
N	11			$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	$5,85 \times 10^{14}$	$5,08 \times 10^{14}$

Desvio padrão residual

Ajuste linear

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

$$S_{y/x} = 7646168,2$$

Ajuste polinomial

$$S_{y_2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 3}}$$

$$S_{y_2} = 7511429,4$$

Diferença das variâncias

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y_2}^2$$

$$DS^2 = 7,68 \times 10^{13}$$

Teste PG

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y_2}^2}$$

$$PG = 1,362$$

$$F_{(1, N-3, 99\%)} = 11,259 \quad (\text{Valor tabelado})$$

PG < F OK O ajuste polinomial não é significativamente melhor que o linear.

A5.2. Ácidos orgânicos

Tabela A5.2 - Teste de linearidade de Mandel para o ácido cítrico.

i (Cítrico)	x _i (mg/L)	y _i (UA)	\hat{y}_i linear	\hat{y}_i polinomial	Ajuste linear (y _i - \hat{y}_i) ²	Ajuste polinomial (y _i - \hat{y}_i) ²
1	201,75	463862	331299,6	432113,142	1,76x10 ¹⁰	1,01x10 ⁹
2	201,75	467688	331299,6	432113,142	1,86x10 ¹⁰	1,27x10 ⁹
3	403,50	673036	831195,5	849992,268	2,50x10 ¹⁰	3,13x10 ¹⁰
4	403,50	673452	831195,5	849992,268	2,49x10 ¹⁰	3,12x10 ¹⁰
5	1008,75	1956522	2330883,3	2166149,55	1,40x10 ¹¹	4,39x10 ¹⁰
6	1008,75	2006320	2330883,3	2166149,55	1,05x10 ¹¹	2,55x10 ¹⁰
7	2017,50	4732619	4830362,8	4568144,7	9,55x10 ⁹	2,71x10 ¹⁰
8	2017,50	4759527	4830362,8	4568144,7	5,02x10 ⁹	3,66x10 ¹⁰
9	4035,00	10090145	9829322,0	10153633,8	6,80x10 ¹⁰	4,03x10 ⁹
N	9			$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	3,22x10 ¹¹	1,55x10 ¹¹

Desvio padrão residual

Ajuste linear

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

$$S_{y/x} = 214405,2$$

Ajuste polinomial

$$S_{y_2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 3}}$$

$$S_{y_2} = 160469,1$$

Diferença das variâncias

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y_2}^2$$

$$DS^2 = 1,67 \times 10^{11}$$

Teste PG

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y_2}^2}$$

$$PG = 6,496$$

$$F_{(1, N-3, 99\%)} = 13,745 \quad (\text{Valor tabelado})$$

PG < F OK O ajuste polinomial não é significativamente melhor que o linear.

Anexo 6 - Folha de cálculo da repetibilidade e precisão intermédia

Fórmulas e dados:

Açúcares

$$V_{\text{extração}} = 100\text{mL}$$

$$m_{\text{amostra}} = 3\text{g}$$

$$\text{Teor (mg/mL)} = \frac{\text{Área} - b}{m}$$

$$\text{Teor (g/100g)} = \frac{100 \times \text{teor (mg/mL)} \times V_{\text{balão}} \text{ (mL)}}{1000 \times m_{\text{amostra}} \text{ (g)}}$$

Ácidos orgânicos

$$V_{\text{extração}} = 23\text{mL}$$

$$m_{\text{amostra}} = 3\text{g}$$

$$\text{Teor (}\mu\text{g/mL)} = \frac{\text{Área} - b}{m}$$

$$\text{Teor (mg/100g)} = \frac{100 \times \text{teor (}\mu\text{g/mL)} \times V_{\text{balão}} \text{ (mL)}}{1000 \times m_{\text{amostra}} \text{ (g)}}$$

Coeficiente de variação de repetibilidade:

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

Desvio padrão absoluto da repetibilidade:

$$S_{ri} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

Coeficiente de variação da precisão intermédia:

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

Desvio padrão absoluto da precisão:

$$S_{Ri} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

A6.1. Açúcares

Tabela A6.1.1 - Resultados obtidos do cálculo da repetibilidade nos açúcares, padrão misto 10 g/L, N=6.

Data/hora	Analito	Área (UA)	b (UA)	m (UA/g/L)	C (g/L)	Teor (g/100g)
2019-09-15 5:00h	Sacarose	13963151	270178,9	1492932,9	9,2	30,6
	Glucose	14458772	318717,5	1384249,5	10,2	34,0
	Frutose	15299995	5733,8	1543004,6	9,9	33,0
	Sorbitol	14503726	50709,5	1424985,9	10,1	33,8
2019-09-15 15:00h	Sacarose	13231803	270178,9	1492932,9	8,7	28,9
	Glucose	13079285	318717,5	1384249,5	9,2	30,7
	Frutose	14116312	5733,8	1543004,6	9,1	30,5
	Sorbitol	13478273	50709,5	1424985,9	9,4	31,4
2019-09-15 14:00h	Sacarose	13963151	270178,9	1492932,9	9,2	30,6
	Glucose	14458772	318717,5	1384249,5	10,2	34,0
	Frutose	15299995	5733,8	1543004,6	9,9	33,0
	Sorbitol	14400726	50709,5	1424985,9	10,1	33,6
2019-09-15 16:00h	Sacarose	13963172	270178,9	1492932,9	9,2	30,6
	Glucose	14458790	318717,5	1384249,5	10,2	34,0
	Frutose	15300015	5733,8	1543004,6	9,9	33,0
	Sorbitol	14400751	50709,5	1424985,9	10,1	33,6
2019-09-15 17:00h	Sacarose	13963160	270178,9	1492932,9	9,2	30,6
	Glucose	14458782	318717,5	1384249,5	10,2	34,0
	Frutose	15299990	5733,8	1543004,6	9,9	33,0
	Sorbitol	14103729	50709,5	1424985,9	9,9	32,9
2019-09-15 18:00h	Sacarose	13963181	270178,9	1492932,9	9,2	30,6
	Glucose	14458800	318717,5	1384249,5	10,2	34,0
	Frutose	15300010	5733,8	1543004,6	9,9	33,0
	Sorbitol	14003754	50709,5	1424985,9	9,8	32,6
Resultados	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol		
S_{ri} (g/100g)	0,7	1,4	1,0	0,9		
S_{ri}^2 (g/100g) ²	0,4	1,8	1,1	0,8		
Média (g/100g)	30,3	33,5	32,6	33,0		
CVr (%)	2,2	4,0	3,2	2,7		

Tabela A6.1.2 - Resultados obtidos do cálculo da repetibilidade nos açúcares, padrão misto 30 g/L, N=6.

Data/hora	Analito	Área (UA)	b (UA)	m (UA/g/L)	C (g/L)	Teor (g/100g)
2019-09-15 18:41h	Sacarose	46910618	270178,9	1492932,9	31,2	104,1
	Glucose	43724184	318717,5	1384249,5	31,4	104,5
	Frutose	48572404	5733,8	1543004,6	31,5	104,9
	Sorbitol	43426518	50709,5	1424985,9	30,4	101,5
2019-09-15 00:51h	Sacarose	50287939	270178,9	1492932,9	33,5	111,7
	Glucose	46026712	318717,5	1384249,5	33,0	110,1
	Frutose	50080469	5733,8	1543004,6	32,5	108,2
	Sorbitol	47455287	50709,5	1424985,9	33,3	110,9
2019-09-15 15:23h	Sacarose	45210274	270178,9	1492932,9	30,1	100,3
	Glucose	42511426	318717,5	1384249,5	30,5	101,6
	Frutose	47789925	5733,8	1543004,6	30,9	103,2
	Sorbitol	43167150	50709,5	1424985,9	30,3	100,9
2019-09-15 15:42h	Sacarose	44987783	270178,9	1492932,9	29,9	99,8
	Glucose	42475574	318717,5	1384249,5	30,5	101,5
	Frutose	45459625	5733,8	1543004,6	29,5	98,2
	Sorbitol	43305390	50709,5	1424985,9	30,4	101,2
2019-09-15 16:01h	Sacarose	45298710	270178,9	1492932,9	30,2	100,5
	Glucose	41548880	318717,5	1384249,5	29,8	99,3
	Frutose	45685465	5733,8	1543004,6	29,6	98,7
	Sorbitol	43727708	50709,5	1424985,9	30,7	102,2
2019-09-15 16:20h	Sacarose	44999471	270178,9	1492932,9	29,9	99,9
	Glucose	42363488	318717,5	1384249,5	30,4	101,2
	Frutose	46826710	5733,8	1543004,6	30,3	101,1
	Sorbitol	43269906	50709,5	1424985,9	30,3	101,1

Resultados	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol
S_r (g/100g)	4,7	3,8	3,8	3,9
S_r^2 (g/100g) ²	21,8	14,7	14,7	15,4
Média (g/100g)	102,7	103,0	102,4	102,9
CVr (%)	4,5	3,7	3,7	3,8

Tabela A6.1.3 - Resultados obtidos do cálculo de precisão intermédia nos açúcares, padrão misto 10 g/L, N=6.

Data	Analito	Área (UA)	b (UA)	m (UA/g/L)	C (g/L)	Teor (g/100g)
2019-09-15	sacarose	13963151	270178,9	1492932,9	9,17	30,6
	glucose	14458772	318717,5	1384249,5	10,21	34,0
	frutose	15299995	5733,8	1543004,6	9,91	33,0
	sorbitol	14203726	50709,5	1424985,9	9,93	33,1
2019-09-24	sacarose	13231803	270178,9	1492932,9	8,68	28,9
	glucose	13079285	318717,5	1384249,5	9,22	30,7
	frutose	14116312	5733,8	1543004,6	9,14	30,5
	sorbitol	13288273	50709,5	1424985,9	9,29	31,0
2019-09-30	sacarose	14603432	270178,9	1492932,9	9,60	32,0
	glucose	13942225	318717,5	1384249,5	9,84	32,8
	frutose	15889321	5733,8	1543004,6	10,29	34,3
	sorbitol	14094828	50709,5	1424985,9	9,86	32,9
2019-09-14	sacarose	13963169	270178,9	1492932,9	9,17	30,6
	glucose	14458899	318717,5	1384249,5	10,22	34,1
	frutose	15299989	5733,8	1543004,6	9,91	33,0
	sorbitol	13503947	50709,5	1424985,9	9,4	31,5
2019-09-16	sacarose	13231910	270178,9	1492932,9	8,68	28,9
	glucose	13079398	318717,5	1384249,5	9,22	30,7
	frutose	14116410	5733,8	1543004,6	9,14	30,5
	sorbitol	13288400	50709,5	1424985,9	9,3	31,0
2019-09-25	sacarose	13231829	270178,9	1492932,9	8,68	28,9
	glucose	13079325	318717,5	1384249,5	9,22	30,7
	frutose	14116341	5733,8	1543004,6	9,14	30,5
	sorbitol	13288318	50709,5	1424985,9	9,3	31,0

Resultados	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol
S_{Ri} (g/100g)	1,3	1,7	1,7	1,0
S_{Ri}^2 (g/100g) ²	1,6	2,7	2,9	1,0
média (g/100g)	30,0	32,2	32,0	31,7
CV_R (%)	4,2	5,1	5,3	3,1

Tabela A6.1.4 - Resultados obtidos do cálculo de precisão intermédia nos açúcares, padrão misto 30 g/L, N=6.

Data/hora	Analito	Área (UA)	b (UA)	m (UA/g/L)	C (g/L)	Teor (g/100g)
2019-09-15 16:20h	Sacarose	44999471	270178,9	1492932,9	29,96	99,9
	Glucose	42363488	318717,5	1384249,5	30,37	101,2
	Frutose	46826710	5733,8	1543004,6	30,34	101,1
	Sorbitol	43269906	50709,5	1424985,9	30,33	101,1
2019-09-18 12:09h	Sacarose	45194417	270178,9	1492932,9	30,09	100,3
	Glucose	41082304	318717,5	1384249,5	29,45	98,2
	Frutose	46621524	5733,8	1543004,6	30,21	100,7
	Sorbitol	40795744	50709,5	1424985,9	28,59	95,3
2019-09-30 14:50h	Sacarose	45302280	270178,9	1492932,9	30,16	100,5
	Glucose	46207302	318717,5	1384249,5	33,15	110,5
	Frutose	46643315	5733,8	1543004,6	30,23	100,8
	Sorbitol	42336912	50709,5	1424985,9	29,67	98,9
2019-09-22 19:28h	Sacarose	44336346	270178,9	1492932,9	29,52	98,4
	Glucose	42363488	318717,5	1384249,5	30,37	101,2
	Frutose	44037186	5733,8	1543004,6	28,54	95,1
	Sorbitol	43167150	50709,5	1424985,9	30,26	100,9
2019-09-24 20:34h	Sacarose	44273353	270178,9	1492932,9	29,47	98,2
	Glucose	43207302	318717,5	1384249,5	30,98	103,3
	Frutose	43752984	5733,8	1543004,6	28,35	94,5
	Sorbitol	39697481	50709,5	1424985,9	27,82	92,7
2019-09-29 17:32h	Sacarose	39359944	270178,9	1492932,9	26,18	87,3
	Glucose	45911391	318717,5	1384249,5	32,94	109,8
	Frutose	47163245	5733,8	1543004,6	30,56	101,9
	Sorbitol	44400533	50709,5	1424985,9	31,12	103,7

Resultados	Sacarose	Glucose	Frutose	Sorbitol
S_{Ri} (g/100g)	5,1	5,0	3,3	4,1
S_{Ri}^2 (g/100g) ²	25,7	25,1	10,8	16,6
Média (g/100g)	97,4	104,0	99,0	98,8
CV _R (%)	5,2	4,8	3,3	4,1

A6.2. Ácidos orgânicos

Tabela A6.2.1 - Resultados obtidos do cálculo da repetibilidade nos ácidos orgânicos, padrão misto O4, N=4.

Data/nº da injeção	Analito	Área (UA)	b (UA)	m (UA/mg/L)	C (mg/L)	Teor (mg/100g)
2019-07-03 Inj. 1	Oxálico	780480	11403,2	19011,6	40,5	31,0
	Tartárico	3278353	-251344,9	3940,2	895,8	686,8
	Lático	10996357	-887541,3	12641,2	940,1	720,7
	Ascórbico	38151767	5654235,0	35044,4	927,3	710,9
	Acético	820989	-203895,0	1178,0	870,0	667,0
	Cítrico	1956522	-310662,3	2530,3	896,0	686,9
	Málico	3307582	-373388,8	4245,0	867,1	664,8
2019-07-03 Inj. 2	Propiónico	903975	-99303,6	1190,5	842,7	646,1
	Oxálico	832166	11403,2	19011,6	43,2	33,1
	Tartárico	3260549	-251344,9	3940,2	891,3	683,3
	Lático	11142055	-887541,3	12641,2	951,6	729,6
	Ascórbico	38620807	5654235,0	35044,4	940,7	721,2
	Acético	839577	-203895,0	1178,0	885,8	679,1
	Cítrico	2006320	-310662,3	2530,3	915,7	702,0
2019-07-03 Inj. 3	Málico	3269479	-373388,8	4245,0	858,2	657,9
	Propiónico	917842	-99303,6	1190,5	854,4	655,0
	Oxálico	780480	11403,2	19011,6	40,5	31,0
	Tartárico	3278353	-251344,9	3940,2	895,8	686,8
	Lático	10996357	-887541,3	12641,2	940,1	720,7
	Ascórbico	38151768	5654235,0	35044,4	927,3	710,9
	Acético	820989	-203895,0	1178,0	870,0	667,0
2019-07-03 Inj. 4	Cítrico	1956522	-310662,3	2530,3	896,0	686,9
	Málico	3307582	-373388,8	4245,0	867,1	664,8
	Propiónico	903975	-99303,6	1190,5	842,7	646,1
	Oxálico	832167	11403,2	19011,6	43,2	33,1
	Tartárico	3260560	-251344,9	3940,2	891,3	683,3
	Lático	11142057	-887541,3	12641,2	951,6	729,6
	Ascórbico	38620808	5654235,0	35044,4	940,7	721,2
2019-07-03 Inj. 4	Acético	839578	-203895,0	1178,0	885,8	679,1
	Cítrico	2006321	-310662,3	2530,3	915,7	702,0
	Málico	3269480	-373388,8	4245,0	858,2	657,9
	Propiónico	917843	-99303,6	1190,5	854,4	655,0

Resultados (O4)	Oxálico	Tartárico	Lático	Ascórbico	Acético	Cítrico	Málico	Propiónico
S_{ii} (mg/100g)	1,2	2,0	5,1	5,9	7,0	8,7	4,0	5,2
S_{ii}^2 (mg/100g) ²	1,4	4,0	26,0	35,1	48,8	75,9	15,8	26,6
média (mg/100g)	32,1	684,5	725,2	716,1	673,1	694,5	661,4	650,5
CVr (%)	3,8	0,3	0,7	0,8	1,0	1,3	0,6	0,8

Tabela A6.2.2 - Valores para cálculo da repetibilidade nos ácidos orgânicos, padrão misto O6, N=6.

Data/nº da injeção	Analito	Área (UA)	b (UA)	m (UA/mg/L)	C (mg/L)	Teor (mg/100g)		
2019-07-03 Inj. 1	Oxálico	4172536	11403,2	19011,6	218,9	167,8		
	Tartárico	15962099	-251344,9	3940,2	4114,9	3154,7		
	Lático	49674384	-887541,3	12641,2	3999,8	3066,5		
	Ascórbico	69378574	-99303,6	1190,5	1818,4	1394,1		
	Acético	4694540	5654235,0	35044,4	4158,3	3188,0		
	Cítrico	10090145	-203895,0	1178,0	4110,5	3151,4		
	Málico	16980850	-310662,3	2530,3	4088,2	3134,3		
	Propiónico	4744243	-373388,8	4245,0	4068,4	3119,1		
2019-07-03 Inj. 2	Oxálico	4207273	11403,2	19011,6	220,7	169,2		
	Tartárico	15763428	-251344,9	3940,2	4064,4	3116,1		
	Lático	50591729	-887541,3	12641,2	4072,3	3122,1		
	ascórbico	70887817	-99303,6	1190,5	1861,5	1427,1		
	Acético	4529870	5654235,0	35044,4	4018,5	3080,8		
	Cítrico	9866960	-203895,0	1178,0	4022,3	3083,8		
	Málico	16955129	-310662,3	2530,3	4082,1	3129,6		
	Propiónico	4739288	-373388,8	4245,0	4064,2	3115,9		
2019-07-03 Inj. 3	Oxálico	4172537	11403,2	19011,6	218,9	167,8		
	Tartárico	15962100	-251344,9	3940,2	4114,8	3154,7		
	Lático	49674385	-887541,3	12641,2	3999,8	3066,5		
	Ascórbico	69378576	-99303,6	1190,5	1818,4	1394,1		
	Acético	4694541	5654235,0	35044,4	4158,3	3188,0		
	Cítrico	10090146	-203895,0	1178,0	4110,5	3151,4		
	Málico	16980851	-310662,3	2530,3	4088,2	3134,3		
	Propiónico	4744244	-373388,8	4245,0	4068,4	3119,1		
2019-07-03 Inj. 4	Oxálico	4207271	11403,2	19011,6	220,7	169,2		
	Tartárico	15763427	-251344,9	3940,2	4064,4	3116,1		
	Lático	50591728	-887541,3	12641,2	4072,3	3122,1		
	Ascórbico	70887818	-99303,6	1190,5	1861,4	1427,1		
	Acético	4529869	5654235,0	35044,4	4018,5	3080,8		
	Cítrico	9866958	-203895,0	1178,0	4022,3	3083,8		
	Málico	16955128	-310662,3	2530,3	4082,1	3129,6		
	Propiónico	4739287	-373388,8	4245,0	4064,2	3115,9		
Resultados (O6)								
Oxálico	0,8	22,3	32,1	63,9	39,0	2,7	1,8	19,1
S_{ri}^2 (mg/100g) ²	0,7	498,1	1031,8	3828,5	1524,3	7,2	3,4	363,4
média (mg/100g)	168,5	3128,9	3094,3	3134,4	3117,6	3131,9	3117,5	1410,6
CVr (%)	0,5	0,7	1,0	2,0	1,3	0,1	0,1	1,4

Tabela A6.2.3 - Resultados obtidos do cálculo de precisão intermédia nos ácidos orgânicos, padrão misto O4, N=4.

Data/hora	Analito	Área (UA)	b (UA)	m (UA/mg/L)	C (mg/L)	Teor (mg/100g)		
24/06/2019 19:44h	Oxálico	4549667	284690,3	65615,5	65,0	49,8		
	Tartárico	5789618	-327367,0	1726,7	3542,7	2716,1		
	Lático	2581322	132773,3	1726,7	1418,1	1087,2		
	Ascórbico	16561398	-3718409,0	19104,6	1061,5	813,8		
	Acético	5687189	-1121095,4	6789,0	1002,8	768,8		
	Cítrico	1837678	70818,1	1258,7	1403,7	1076,2		
	Málico	3068402	141791,4	2302,1	1271,3	974,6		
	Propiónico	1499210	54088,3	1034,9	1396,4	1070,6		
21/06/2019 22:20h	Oxálico	4844611	284690,3	65615,5	69,5	53,3		
	Tartárico	5318379	-327367,0	1726,7	3269,8	2506,8		
	Lático	2525919	132773,3	1726,7	1386,0	1062,6		
	Ascórbico	16812280	-3718409,0	19104,6	1074,7	823,9		
	Acético	6200519	-1121095,4	6789,0	1078,5	826,8		
	Cítrico	1821603	70818,1	1258,7	1391,0	1066,4		
	Málico	3085260	141791,4	2302,1	1278,6	980,3		
	Propiónico	1470547	54088,3	1034,9	1368,7	1049,3		
25/06/2019 00:00h	Oxálico	4549667	284690,3	65615,5	65,0	49,8		
	Tartárico	5789618	-327367,0	1726,7	3542,7	2716,1		
	Lático	2581322	132773,3	1726,7	1418,1	1087,2		
	Ascórbico	15612270	-3718409,0	19104,6	1011,8	775,7		
	Acético	5687189	-1121095,4	6789,0	1002,8	768,8		
	Cítrico	1837678	70818,1	1258,7	1403,7	1076,2		
	Málico	3068402	141791,4	2302,1	1383,7	1060,9		
	Propiónico	1499210	54088,3	1034,9	1396,4	1070,6		
09/05/2019 20:02h	Oxálico	4199283	284690,3	65615,5	59,7	45,7		
	Tartárico	4834997	-327367,0	1726,7	2989,8	2292,2		
	Lático	2387942	132773,3	1726,7	1306,1	1001,3		
	Ascórbico	15561856	-3718409,0	19104,6	1009,2	773,7		
	Acético	820989	-1121095,4	6789,0	824,4	2496,5		
	Cítrico	2052797	70818,1	1258,7	1574,7	1207,2		
	Málico	3809037	141791,4	2302,1	1314,2	1007,5		
	Propiónico	1602213	54088,3	1034,9	1495,9	1146,9		
Resultados (O4)								
	Oxálico	Tartárico	Lático	Ascórbico	Acético	Cítrico	Málico	Propiónico
S _{Ri} (g/100g)	3,1	202,7	40,5	25,8	82,7	67,3	43,1	42,9
S _{Ri} ² (g/100g) ²	9,5	41079,8	1642,4	666,8	44650,5	4530,0	1858,3	43655,5
Média (g/100g)	49,7	2557,8	1059,6	796,8	892,9	1106,5	1029,8	959,1
CV _R (%)	6,2	7,9	3,8	3,2	9,3	6,1	4,2	4,5

Tabela A6.2.4 - Resultados obtidos do cálculo de precisão intermédia nos ácidos orgânicos, padrão misto O6, N=4.

Data/hora	Analito	Área (UA)	b (UA)	m (UA/mg/L)	C (mg/L)	Teor (mg/100g)
24/06/2019 19:44h	Oxálico	8744568	284690,3	65615,5	128,9	98,8
	Tartárico	11676774	-327367,0	1726,7	6952,2	5330,1
	Lático	5316441	132773,3	1726,7	3002,1	2301,6
	Ascórbico	49642584	-3718409,0	19104,6	2793,1	2141,4
	Acético	20928250	-1121095,4	6789,0	3247,8	2490,0
	Cítrico	3908275	70818,1	1258,7	3048,8	2337,4
	Málico	3003366	141791,4	2302,1	3204,8	1803,0
	Propiónico	3323229	54088,3	1034,9	3158,9	2421,8
21/06/2019 21:00h	Oxálico	8930686	284690,3	65615,5	131,8	101,0
	Tartárico	11219798	-327367,0	1726,7	6687,6	5127,1
	Lático	5318620	132773,3	1726,7	3003,4	2302,6
	Ascórbico	45642987	-3718409,0	19104,6	2583,7	1980,9
	Acético	21965217	-1121095,4	6789,0	3400,5	2607,1
	Cítrico	3762409	70818,1	1258,7	2932,9	2248,6
	Málico	5637269	141791,4	2302,1	2876,6	2205,4
	Propiónico	3261540	54088,3	1034,9	3099,3	2376,1
25/06/2019 00:00h	Oxálico	8744568	284690,3	65615,5	128,9	98,8
	Tartárico	11676774	-327367,0	1726,7	6952,2	5330,1
	Lático	5316441	132773,3	1726,7	3002,1	2301,6
	Ascórbico	46942588	-3718409,0	19104,6	2651,8	2033,0
	Acético	20928250	-1121095,4	6789,0	3247,8	2490,0
	Cítrico	3908275	70818,1	1258,7	3048,8	2337,4
	Málico	5555647	141791,4	2302,1	3006,3	2304,9
	Propiónico	3323229	54088,3	1034,9	3158,9	2421,8
09/05/2019 20:02h	Oxálico	8403191	284690,3	65615,5	123,7	94,9
	Tartárico	11119808	-327367,0	1726,7	6629,7	4791,7
	Lático	5017211	132773,3	1726,7	2828,8	2168,8
	Ascórbico	47642589	-3718409,0	19104,6	2688,4	2061,1
	Acético	44258085	-1121095,4	6789,0	6684,2	5124,6
	Cítrico	4147526	70818,1	1258,7	3238,9	2483,1
	Málico	3464348	141791,4	2302,1	3178,3	2199,3
	Propiónico	3401106	54088,3	1034,9	3234,1	2479,5

Resultados	Oxálico	Tartárico	Lático	Ascórbico	Acético	Cítrico	Málico	Propiónico
S _{Ri} (g/100g)	2,6	131,2	66,6	67,0	59,8	97,2	118,2	42,4
S _{Ri} ² (g/100g) ²	6,6	17219,2	4434,8	4490,9	3573,5	9440,6	13967,4	127387,4
média (g/100g)	98,4	5217,5	2268,7	2054,1	2517,5	2351,6	2351,0	2584,7
CV _R (%)	2,6	2,5	2,9	3,3	2,4	4,1	5,0	1,6

Anexo 7 - Folha de cálculo do teor de analito e taxa de recuperação

Fórmulas usadas

$$C_{\text{analito}} = \frac{\text{Área} - b}{m}$$

$$\text{Teor (g/100g)} = \frac{100 \cdot C_{\text{analito}} \text{ (g/L)} \cdot V_{\text{balão}}}{m_{\text{amostra}} \cdot 1000}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

$$SE = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$CV (\%) = 100 \frac{S}{\text{Teor}}$$

$$\text{Taxa de Recuperação} (\%) = 100 \frac{(C_{\text{fortificada}} - C_{\text{matriz}})}{C_{\text{adicionada}}}$$

A7.1. Açúcares

Folha de cálculo dos teores obtidos a partir dos dados dos cromatogramas exemplo para a amostra de cenoura.

Tabela A7.1.1 - Resultados obtidos dos cromatogramas e cálculo dos teores.

Amostra/Injeção Data	Analito	tr (min)	Área (UA)	b (UA)	m (UA/mg/L)	C (g/L)	m _{amostra} (g)	Teor (g/100g)	C média (g/L)	Teor médio (g/100g)
Cenoura E1_1 25/09/2019	Sacarose	7,01	1999986	270179	1492933	1,16	3,0655	3,8		
	Glucose	8,57	740230	318718	1384249	0,30	3,0655	1,0		
	Frutose	10,17	572660	5734	1543005	0,37	3,0655	1,2	1,0	3,3
	Sorbitol	13,67	24070	50709	1424986	0	3,0655	0	0,3	0,8
Cenoura E1_1 29/09/2019	Sacarose	7,10	1595417	270179	1492933	0,89	3,0655	2,9	0,4	1,3
	Glucose	8,66	599011	318718	1384249	0,20	3,0655	0,7	0,0	0,1
	Frutose	10,33	709125	5734	1543005	0,46	3,0655	1,5		
	Sorbitol	14,22	138527	50709	1424986	0,06	3,0655	0,2		
Cenoura E1_3 15/09/2019	Sacarose	7,09	1624571	270179	1492933	0,91	3,0866	2,9		
	Glucose	8,67	669428	318718	1384249	0,25	3,0866	0,8		
	Frutose	10,30	619788	5734	1543005	0,40	3,0866	1,3	0,9	3,0
	Sorbitol	13,89	61848	50709	1424986	0,01	3,0866	0,0	0,3	0,8
Cenoura E1_3 15/09/2019	Sacarose	7,09	1665636	270179	1492933	0,93	3,0866	3,0	0,4	1,3
	Glucose	8,67	654509	318718	1384249	0,24	3,0866	0,8	0,0	0,0
	Frutose	10,30	608663	5734	1543005	0,39	3,0866	1,3		
	Sorbitol	13,88	63976	50709	1424986	0,01	3,0866	0,0		
Cenoura E2_1 15/09/2019	Sacarose	7,09	1756934	270179	1492933	1,00	3,0036	3,3		
	Glucose	8,66	732694	318718	1384249	0,30	3,0036	1,0		
	Frutose	10,30	666839	5734	1543005	0,43	3,0036	1,4	1,0	3,3
	Sorbitol	13,78	59129	50709	1424986	0,01	3,0036	0,0	0,3	1,0
Cenoura E2_1 15/09/2019	Sacarose	7,09	1712502	270179	1492933	0,97	3,0036	3,2	0,4	1,4
	Glucose	8,66	728996	318718	1384249	0,30	3,0036	1,0	0,0	0,0
	Frutose	10,30	650191	5734	1543005	0,42	3,0036	1,4		
	Sorbitol	13,78	52898	50709	1424986	0,00	3,0036	0,0		
Cenoura E3_3 25/09/2019	Sacarose	7,01	2120604	270179	1492933	1,24	3,0977	4,0		
	Glucose	8,56	1087403	318718	1384249	0,56	3,0977	1,8		
	Frutose	10,18	1149849	5734	1543005	0,74	3,0977	2,4	1,2	4,0
	Sorbitol	14,07	163899	50709	1424986	0,08	3,0977	0,3	0,6	1,8
Cenoura E3_3 25/09/2019	Sacarose	7,01	2099006	270179	1492933	1,22	3,0977	4,0	0,7	2,4
	Glucose	8,56	1106810	318716	1384249	0,57	3,0977	1,8	0,3	0,3
	Frutose	10,18	1108996	5734	1543005	0,72	3,0977	2,3		
	Sorbitol	14,07	907255	50709	1424986	0,60	3,0977	1,9		
Cenoura E3_4 23/09/2019	Sacarose	7,02	2518316	270179	1492933	1,51	3,0490	4,9		
	Glucose	8,58	1294604	318718	1384249	0,70	3,0490	2,3		
	Frutose	10,19	1110112	5734	1543005	0,72	3,0490	2,3	1,5	4,3
	Sorbitol	13,62	1139630	50709	1424986	0,76	3,0490	2,5	0,7	2,3
Cenoura E3_4 23/09/2019	Sacarose	7,03	2353862	270179	1492933	1,40	3,0490	4,6	0,7	2,6
	Glucose	8,59	1284162	318718	1384249	0,70	3,0490	2,3	0,4	1,3
	Frutose	10,20	1163719	5734	1543005	0,75	3,0490	2,5		
	Sorbitol	14,21	116241	50709	1424986	0,05	3,0490	0,2		

Tabela A7.1.2 - Resultados do teor de açúcares na cenoura (média de 3 extrações independentes) em g/L.

Analito	Teor (g/L)	S (g/L)	SE (g/L)	CV (%)
Sacarose	0,98	0,10	0,06	10
Glucose	0,27	0,04	0,02	15
Frutose	0,41	0,03	0,02	8
Sorbitol	0,02	0,02	0,01	145

Tabela A7.1.3 - Resultados do teor de açúcares na cenoura (média de 3 extrações independentes) em g/100g.

Analito	Teor (g/100g)	S (g/100g)	SE (g/100g)	CV (%)
Sacarose	3,06	0,19	0,11	6
Glucose	0,87	0,10	0,06	12
Frutose	1,34	0,07	0,04	5
Sorbitol	0,04	0,03	0,02	69

Folha de cálculo das taxas de recuperação de açúcares, exemplo para amostra de maçã:

Tabela A7.1.4 - Concentração adicionada às amostras de maçã.

Analito	Extrações E3_3		Extrações E3_4		C _{matriz} (g/L)
	C _{fortificada} (g/L)	C _{adicionada} (g/L)	C _{fortificada} (g/L)	C _{adicionada} (g/L)	
Sacarose	0,75	0,3	0,90	0,5	0,48
Glucose	0,65	0,3	0,85	0,5	0,34
Frutose	1,94	0,3	2,21	0,5	1,66
Sorbitol	0,46	0,3	0,53	0,5	0,14

Tabela A7.1.5 - Taxa de recuperação para a amostra de maçã.

Analito	TR (E3_3) (%)	TR (E3_4) (%)	TR média (%)
Sacarose	92	85	89
Glucose	104	103	104
Frutose	95	111	103
Sorbitol	106	77	91

A7.2. Ácidos orgânicos

Folha de cálculo dos teores obtidos a partir dos dados dos cromatogramas exemplo para a amostra de laranja.

Tabela A7.2.1 - Resultados obtidos dos cromatogramas e cálculo dos teores.

Amostra/Injeção Data	Analito	tr (min)	Área (UA)	b (UA)	m (UA/mg/L)	C (mg/L)	m _{amostra} (g)	Teor (mg/100g)
Laranja E1-2	Oxálico	2,52	3252321	11403,2	19011,6	170,5	3,0574	128,2
	Tartárico	2,68	1013611	-251344,9	3940,2	321,0	3,0574	241,5
	Lático	3,62	907312	-887541,3	12641,2	142,0	3,0574	106,8
	Ascórbico	4,26	8898970	5654235,0	35044,4	92,6	3,0574	69,7
	Acético	3,95	173669	-203895,0	1178,0	320,5	3,0574	241,1
	Cítrico	4,98	2605423	-310662,3	2530,3	1152,5	3,0574	867,0
	Málico	5,56	775336	-373388,8	4245,0	270,6	3,0574	203,6
	Propiónico	7,17	34031	-99303,6	1190,5	112,0	3,0574	84,3
Laranja E2-2	Oxálico	2,52	2246980	11403,2	19011,6	117,6	3,0845	87,7
	Tartárico	2,67	905561	-251344,9	3940,2	293,6	3,0845	219,0
	Lático	3,58	1370341	-887541,3	12641,2	178,6	3,0845	133,2
	Ascórbico	4,01	9078228	5654235,0	35044,4	97,7	3,0845	73,0
	Acético	4,00	515063	-203895,0	1178,0	610,3	3,0845	455,1
	Cítrico	5,65	3056186	-310662,3	2530,3	1330,6	3,0845	992,2
	Málico	6,56	307013	-373388,8	4245,0	160,3	3,0845	119,5
	Propiónico	7,23	87951	-99303,6	1190,5	157,3	3,0845	117,3
Laranja E2-3	Oxálico	2,52	1502017	11403,2	19011,6	78,4	3,0202	59,7
	Tartárico	2,69	1159085	-251344,9	3940,2	358,0	3,0202	272,6
	Lático	2,94	1062608	-887541,3	12641,2	154,3	3,0202	117,5
	Ascórbico	4,01	8781939	5654235,0	35044,4	89,25	3,0202	67,97
	Acético	3,57	500733	-203895,0	1178,0	598,2	3,0202	455,5
	Cítrico	4,00	2683072	-310662,3	2530,3	1183,2	3,0202	901,0
	Málico	5,62	497961	-373388,8	4245,0	205,3	3,0202	156,3
	Propiónico	6,55	82024	-99303,6	1190,5	152,3	3,0202	116,0
Laranja E3-1	Oxálico	2,57	2396510	11403,2	19011,6	125,5	3,0119	95,8
	Tartárico	2,71	1280796	-251344,9	3940,2	388,8	3,0119	296,9
	Lático	3,07	1931960	-887541,3	12641,2	223,0	3,0119	170,3
	Ascórbico	4,01	11291939	5654235,0	35044,4	160,9	3,0119	122,8
	Acético	3,88	1610650	-203895,0	1178,0	436,8	3,0119	333,6
	Cítrico	4,25	2683600	-310662,3	2530,3	1068,8	3,0119	816,1
	Málico	5,90	3309174	-373388,8	4245,0	305,7	3,0119	233,4
	Propiónico	7,91	173602	-99303,6	1190,5	226,8	3,0119	173,2

Amostra/Injeção Data	Analito	tr (min)	Área (UA)	b (UA)	m (UA/mg/L)	C (mg/L)	m _{amostra} (g)	Teor (mg/100g)
Laranja E3-2	Oxálico	2,58	2641846	11403,2	19011,6	138,4	3,0552	104,2
	Tartárico	2,77	2150239	-251344,9	3940,2	609,5	3,0552	458,8
	Lático	3,06	4428926	-887541,3	12641,2	420,6	3,0552	316,6
	Ascórbico	4,25	13690731	5654235,0	35044,4	229,3	3,0552	172,6
	Acético	3,88	673169	-203895,0	1178,0	744,5	3,0552	560,5
	Cítrico	4,25	3046925	-310662,3	2530,3	1327,0	3,0552	998,9
	Málico	5,88	1632001	-373388,8	4245,0	472,4	3,0552	355,6
	Propiónico	6,47	476225	-99303,6	1190,5	483,4	3,0552	363,9

Tabela A7.2.2 - Resultados do teor de ácidos orgânicos na laranja (média de 3 extrações independentes) em mg/L.

Analito	Teor (mg/L)	S (mg/L)	SE (mg/L)	CV (%)
Oxálico	122,2	46,2	26,7	37,8
Tartárico	324,2	32,3	18,6	10,0
Lático	158,3	18,6	10,8	11,8
Ascórbico	93,2	4,26	2,46	4,5
Acético	365,8	8,6	5,0	2,4
Cítrico	982,0	322,2	186,0	32,8
Málico	212,1	55,5	32,0	26,2
Propiónico	140,5	24,8	14,3	17,7

Tabela A7.2.3 - Resultados do teor de ácidos orgânicos na laranja (média de 3 extrações independentes) em g/100g.

Analito	Teor (mg/100g)	S (g/100g)	SE (g/100g)	CV (%)
Oxálico	91,9	34,5	19,9	37,5
Tartárico	244,3	26,9	15,6	11,0
Lático	119,2	13,3	7,7	11,2
Ascórbico	70,2	2,5	1,4	3,6
Acético	383,9	123,7	71,4	32,2
Cítrico	920,1	64,7	37,4	7,0
Málico	159,8	42,1	24,3	26,3
Propiónico	105,8	18,7	10,8	17,7

Folha de cálculo da taxa de recuperação dos ácidos orgânicos:

Tabela A7.2.4 - Concentração adicionada às amostras de laranja.

Analito	Extrações E3_1		Extrações E3_2		C _{matriz} (mg/L)
	C _{fortificada} (mg/L)	C _{adicionada O4} (mg/L)	C _{fortificada} (mg/L)	C _{adicionada O6} (mg/L)	
Oxálico	125,5	3	138,4	17	122,2
Tartárico	388,8	81	609,5	324	324,2
Lático	223,0	81	420,6	323	158,3
Ascórbico	160,9	72	229,3	150	93,2
Acético	436,8	81	744,5	323	365,8
Cítrico	1068,8	81	1327,0	323	982,0
Málico	305,7	81	472,4	322	212,1
Propiónico	226,8	74	483,4	324	140,5

Tabela A7.2.5 - Taxa de recuperação para a amostra de laranja.

Analito	TR (E3_1) (%)	TR (E3_2) (%)	TR média (%)
Oxálico	96	93	95
Tartárico	80	88	84
Lático	80	81	81
Ascórbico	94	91	92
Acético	88	117	103
Cítrico	107	107	107
Málico	116	81	99
Propiónico	116	106	111

Anexo 8 - Gráficos do perfil de analitos por grupo de hortifrutícolas

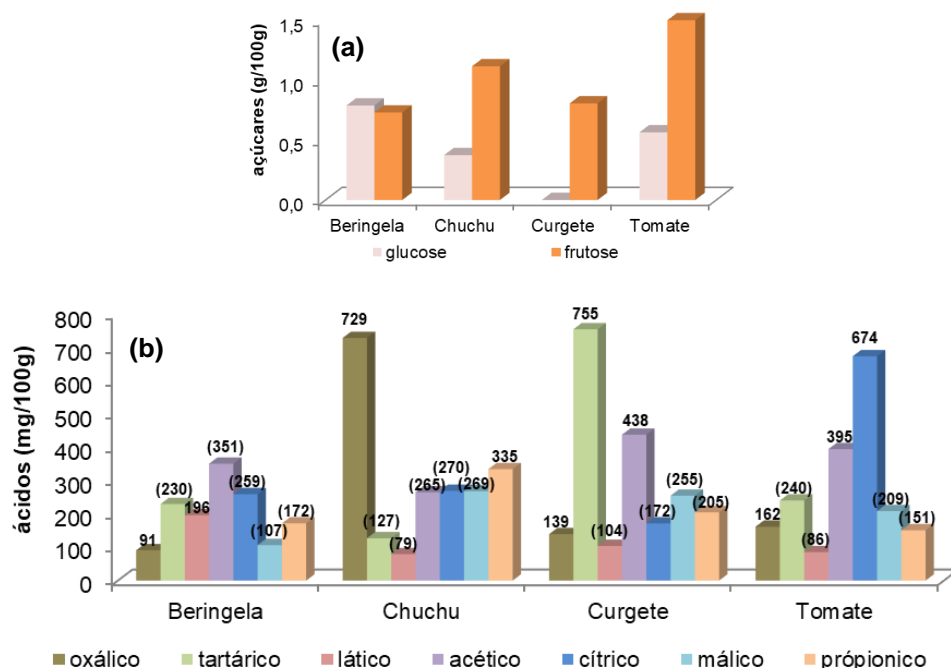


Figura A8.1 - Teores de açúcares (a) e ácidos orgânicos (b) no grupo dos frutos hortícolas, valores entre parêntesis encontram-se entre o limite de deteção e quantificação, colunas sem valores correspondem a analitos identificados mas abaixo do limite de deteção.

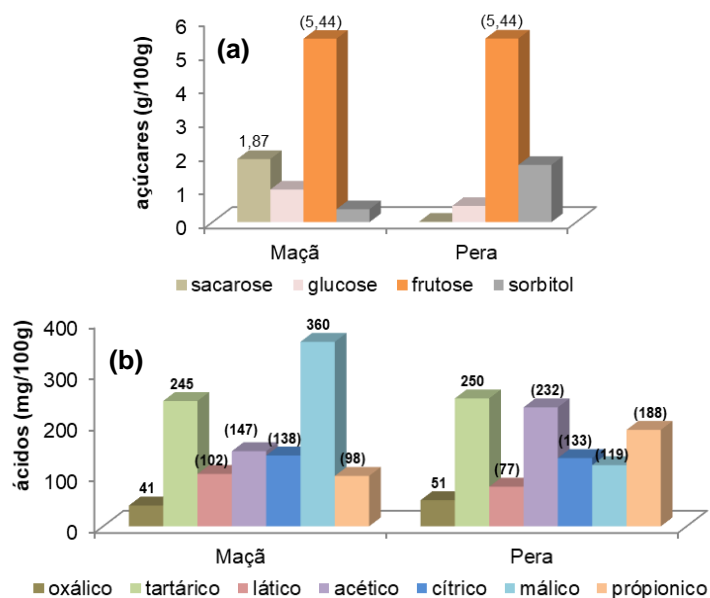


Figura A8.2 - Teores de açúcares (a) e ácidos orgânicos (b) no grupo dos frutos pomóides, valores entre parêntesis encontram-se entre o limite de deteção e quantificação, colunas sem valores correspondem a analitos identificados mas abaixo do limite de deteção.

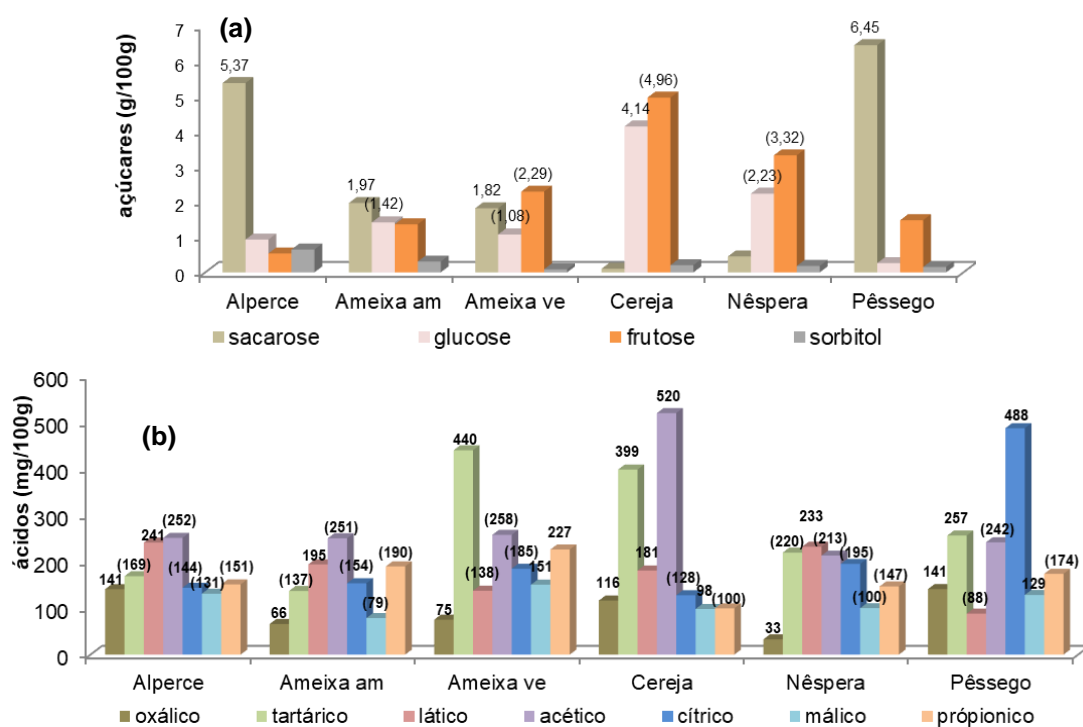


Figura A8.3 - Teores de açúcares (a) e ácidos orgânicos (b) no grupo dos frutos prunóides, valores entre parêntesis encontram-se entre o limite de detecção e quantificação, colunas sem valores correspondem a analitos identificados mas abaixo do limite de detecção.

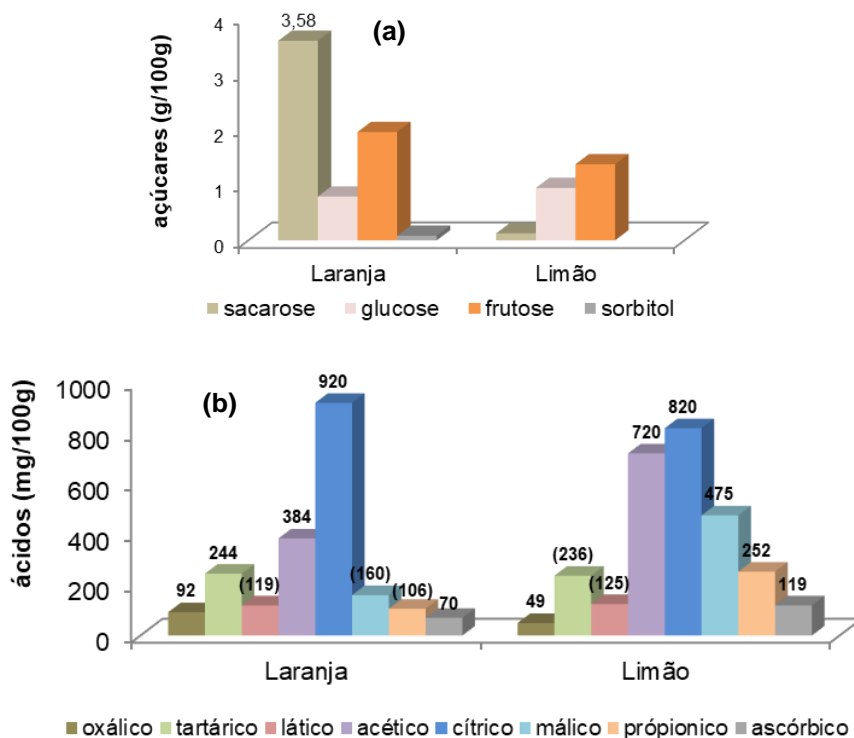


Figura A8.4 - Teores de açúcares (a) e ácidos orgânicos (b) no grupo dos frutos cítricos, valores entre parêntesis encontram-se entre o limite de detecção e quantificação, colunas sem valores correspondem a analitos identificados mas abaixo do limite de detecção.

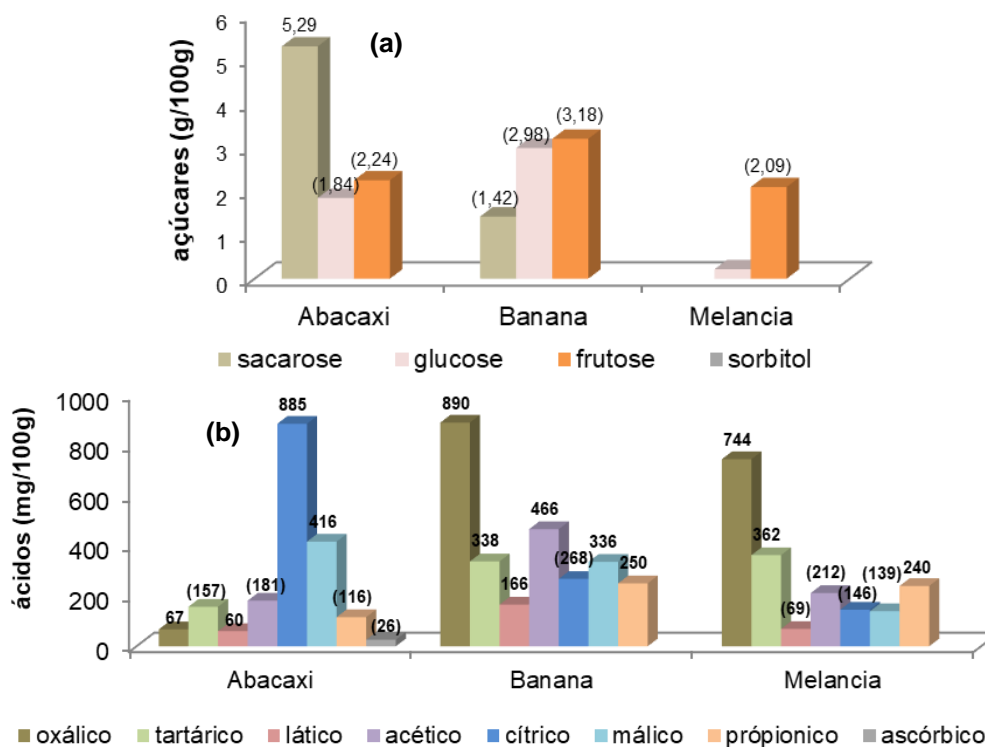


Figura A8.5 - Teores de açúcares **(a)** e ácidos orgânicos **(b)** no grupo dos frutos tropicais, valores entre parêntesis encontram-se entre o limite de detecção e quantificação, colunas sem valores correspondem a analitos identificados mas abaixo do limite de detecção.

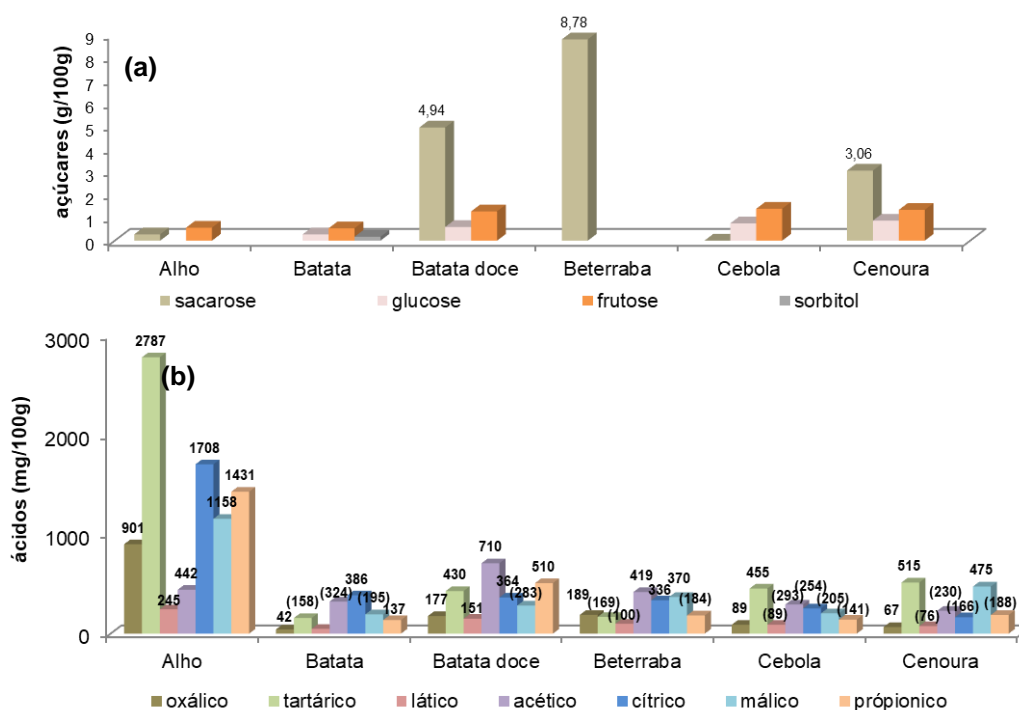


Figura A8.6 - Teores de açúcares **(a)** e ácidos orgânicos **(b)** no grupo das raízes, bolbos e tubérculos, valores entre parêntesis encontram-se entre o limite de detecção e quantificação, colunas sem valores correspondem a analitos identificados mas abaixo do limite de detecção.

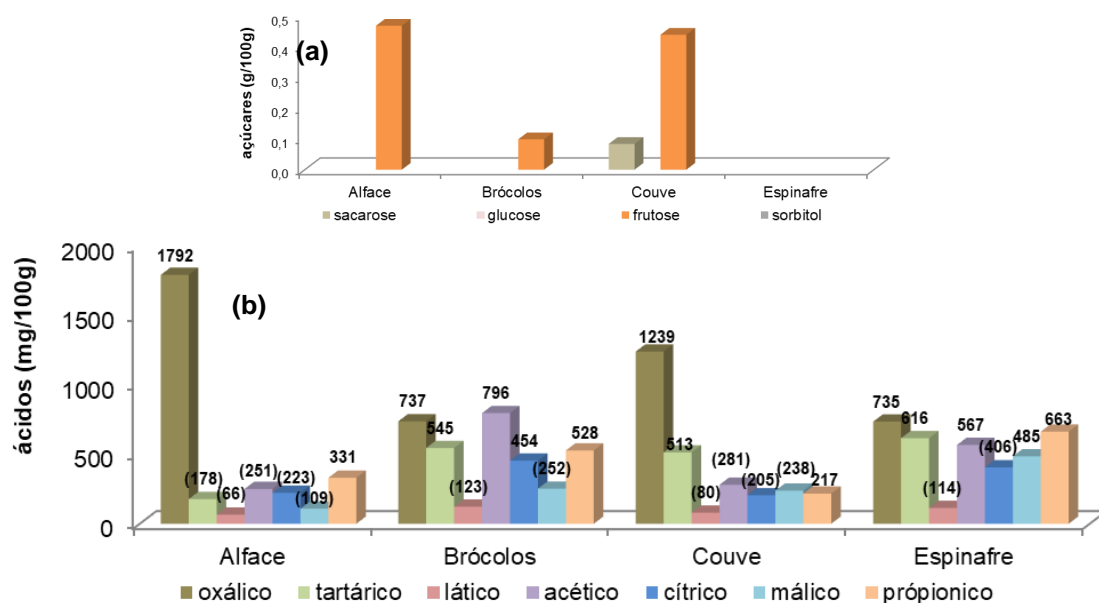


Figura A8.7 - Teores de açúcares **(a)** e ácidos orgânicos **(b)** no grupo das hortaliças folhosas, valores entre parêntesis encontram-se entre o limite de detecção e quantificação, colunas sem valores correspondem a analitos identificados mas abaixo do limite de detecção.

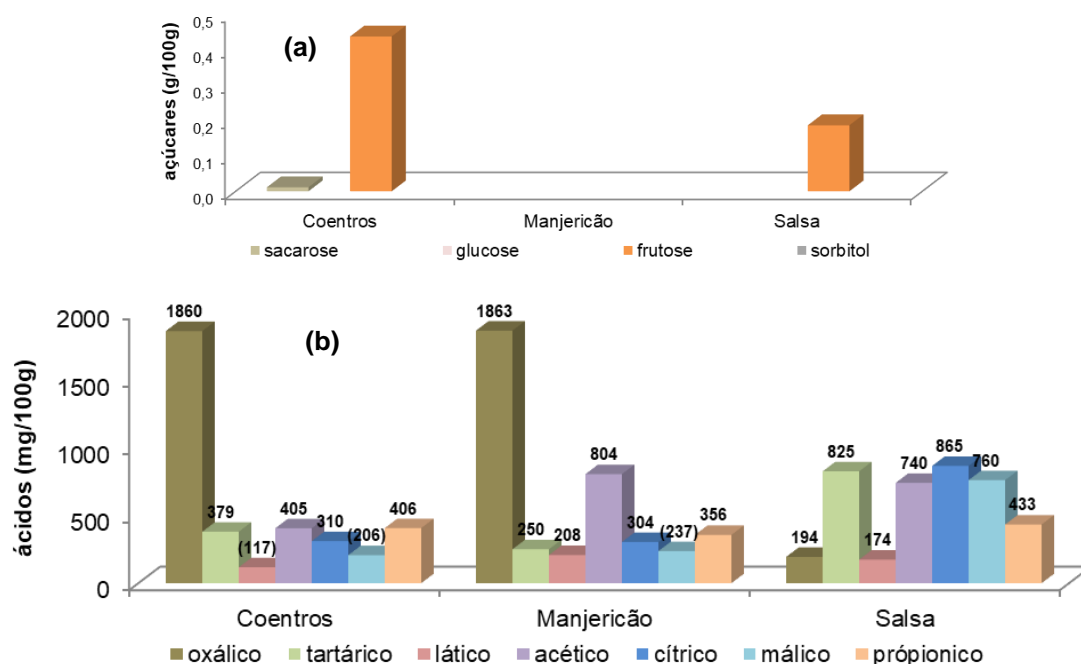


Figura A8.8 - Teores de açúcares **(a)** e ácidos orgânicos **(b)** no grupo das ervas aromáticas, valores entre parêntesis encontram-se entre o limite de detecção e quantificação, colunas sem valores correspondem a analitos identificados mas abaixo do limite de detecção.

Anexo 9 - Intervalo dos teores de analitos por grupo de hortifrutícolas

Tabela A9.1 - Análise da quantificação de analitos em g/100g (açúcares) e mg/100g (ácidos)

Grupos	Açúcares			Ácidos orgânicos							
		Sac	Glu	Oxa	Tar	Lat	Asc	Ace	Cit	Mal	Pro
Frutos Hortícolas (4)	Nº	0	0	4	1	1	0	2	1	0	1
	Min			91	-	-		395	-		-
	Máx			729	755	196		438	674		335
Frutos Pomóides (2)	Nº	1	0	2	2	0	0	0	0	1	0
	Min	-		41	245					-	
	Máx	1,87		51	250					360	
Frutos Prunóides (6)	Nº	4	1	6	3	4	0	1	1	0	1
	Min	1,82	-	33	257	181		-	-		-
	Máx	6,45	4,14	141	440	241		520	488		227
Frutos Cítricos (2)	Nº	1	0	2	1	0	2	2	2	1	1
	Min	-		49	-		70	384	820	-	-
	Máx	3,58		92	244		119	720	920	475	252
Frutos Tropicais (3)	Nº	1	0	3	2	1	0	1	1	2	2
	Min	-		67	338			-	-	336	240
	Máx	5,29		890	362	166		466	885	416	250
Raízes, Bolbos e Tubércolos (6)	Nº	3	0	6	4	2	0	3	4	3	2
	Min	3,06		42	430	151		419	336	370	510
	Máx	8,78		901	2787	245		710	1708	1158	1431
Hortaliças Folhosas (4)	Nº	0	0	4	3	0	0	2	2	1	4
	Min			735	513			567	406	-	217
	Máx			1792	616			796	454	485	663
Ervas aromáticas (3)	Nº	0	0	3	3	2	0	3	3	1	3
	Min			194	250	174		405	304	-	356
	Máx			1863	825	208		804	865	760	433
Analito		Sac	Glu	Oxa	Tar	Lat	Asc	Ace	Cit	Mal	Pro
Minimo		1,82	4,14	33	245	151	70	384	304	336	217
Máximo		8,78	4,14	1863	2787	245	119	804	1708	1158	1431

Nº - número de amostras quantificadas no grupo (teor > LQ); Açúcares (g/100g); Ácidos orgânicos (mg/100g)

