

# Quantificação de Polifosfatos no bacalhau. Validação de um método de análise.

Ana Vinhas

Novembro de 2013

Orientação: Susana Sousa  
Co-Orientação: Cristina Antão



## **Agradecimentos**

À minha orientadora Doutora Susana Sousa por todo o apoio, incentivo e disponibilidade concedidos ao longo de todo este processo.

À minha coorientadora Mestre Cristina Antão por todo o apoio, simpatia e oportunidade de estágio no laboratório Equilibrium do qual é diretora.

A todos os elementos da Equilibrium pela amabilidade e ajuda que sempre ofereceram enquanto eu lá estagiei. Em especial à Sofia Oliveira.

À Doutora Cristina Matos, responsável pelo GRAQ, pela disponibilização dos recursos necessários para a execução da parte experimental.

À Mãe Margarida pela possibilidade e apoio da minha formação durante todos estes anos.

À minha Irmã Ana por toda a compreensão e apoio durante as várias horas de trabalho.

Ao meu namorado João pela paciência, apoio incansável e encorajamento nas horas difíceis.

Aos meus amigos queridos, em especial à Raquel Nevado, pelos momentos fantásticos e por serem os melhores amigos que uma rapariga poderia ter.

Por último mas não menos importante, ao meu querido Pai por ter sonhado um futuro melhor para mim. Por ti e para ti!



## Sumário

O bacalhau (*Gadus morhua*) faz parte da dieta alimentar dos portugueses há vários séculos, sendo atualmente, um dos maiores consumidores deste peixe a nível mundial. Após o processo de salga, esta espécie possui características únicas como a consistência, cheiro, paladar e cor amarela.

É precisamente devido à coloração do peixe que alguns produtores da Islândia, Noruega e Dinamarca requisitaram às autoridades da União Europeia (UE) a aprovação da utilização de polifosfatos no processo de salga húmida do bacalhau. Os polifosfatos são aditivos alimentares bastante usados no processamento do pescado pois previnem a oxidação dos lípidos e proteínas do músculo do bacalhau, evitando assim a indesejada mudança de cor do peixe.

Apesar dos esforços da Associação dos Industriais do Bacalhau (AIB) e do governo português para a rejeição da proposta nórdica, tal não se verificou. Deste modo, no início do próximo ano já será possível a venda na UE de bacalhau com fosfatos.

A quantificação do teor de fosfatos no bacalhau é geralmente efetuada por Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Visível). Esta quantificação é baseada no método de determinação do fósforo total, através da hidrólise dos fosfatos a ortofosfatos com posterior medição da cor amarela, gerada pela reação destes com uma solução de molibdato-vanadato.

O objetivo desta dissertação foi a validação de um método de análise para a quantificação dos polifosfatos no bacalhau. O método validado foi o descrito na norma NP 4495 para produtos de pesca e aquicultura. O desenvolvimento deste trabalho foi realizado em laboratório acreditado para águas e produtos alimentares (Equilibrium - Laboratório de Controlo de Qualidade e de Processos Lda, L0312).

Foi ainda determinada a influência do teor de cloreto de sódio na quantificação dos polifosfatos e o teor de humidade, uma vez que este pode afetar o produto durante a sua comercialização.

No processo de validação do método foram estudados diversos parâmetros, tais como a seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de quantificação e precisão.

Pela análise dos resultados obtidos conclui-se que o método para determinação de fosfatos no bacalhau se encontra validado, uma vez que satisfaz todas as especificações determinadas para cada parâmetro de validação avaliado.

**Palavras-chave:** bacalhau, polifosfatos, Espectrofotometria de absorção molecular no UV-Visível, quantificação dos polifosfatos, validação do método.



## Abstract

Cod (*Gadus morhua*) is part of the diet of the Portuguese for several centuries, being currently one of the largest consumers of this fish in the world. After the salting process, this species has unique characteristics such as consistency, smell, taste and yellow color.

It is was precisely due to fish coloration that some producers of Iceland, Norway and Denmark have requested to the authorities of the European Union (EU) approval for the use of polyphosphates in the process of wet salting of the cod. Polyphosphates are widely used as food additives in fish processing because it prevents the oxidation of lipids and proteins in the cod muscle, preventing undesired color change of the fish.

Despite the efforts of the Association Cod Industrialists and the Portuguese Government in order to reject the proposal Norwegian/Danish/Icelandic, this did not happen. Thus, at the beginning of the next year it will be possible the sale in the EU of cod with phosphates.

The quantification of phosphate level in cod is usually performed through molecular absorption spectrophotometry in the ultraviolet-visible. This quantification is based on the method of determination of total phosphorus by hydrolysis of the phosphate to orthophosphate and subsequent measurement of yellow color generated by the reaction of the orthophosphate with a solution of molybdate - vanadate.

The objective of this thesis was the validation of an analytical method for the quantification of polyphosphates in cod. The validated method it was the described in the standard NP 4495 for fisheries and aquaculture products. The development of this work was carried out in accredited laboratory for water and food (Equilibrium - Quality Control and Process Laboratory Ltd, L0312).

The influence of sodium chloride on the quantification of polyphosphates and moisture content were also assessed, once this can affect the product during commercialization.

In the process of the method validation several parameters were studied such as selectivity, linearity, sensitivity, limit of quantification and precision.

By the analysis of the results obtained it was concluded that the method for determination of phosphates in cod is validated, since it meets the specifications for each validation parameter evaluated.

**Keywords:** cod, polyphosphates, molecular absorption Spectrophotometry in the ultraviolet-visible, polyphosphates quantification, method validation.



## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. O bacalhau .....	1
1.1.1. Breve história.....	1
1.1.2. Caracterização genérica e taxonómica .....	1
1.1.3. Processo de cura.....	4
1.2. Introdução dos polifosfatos como aditivo alimentar .....	5
1.2.1. Atualidade .....	5
1.2.2. Posição dos industriais Portugueses e Governo Português .....	6
1.2.3. Classificação dos fosfatos .....	8
1.2.4. Propriedades físico-químicas dos polifosfatos .....	10
1.2.5. Aplicação dos polifosfatos como aditivo alimentar .....	11
1.2.6. Legislação em vigor.....	12
1.3. Quantificação dos polifosfatos .....	13
1.3.1. Métodos de análise.....	13
1.3.1.1. HPLC .....	13
1.3.1.2. Cromatografia iónica .....	13
1.3.1.3. Espectrofotometria de absorção molecular no UV-Visível.....	15
1.3.2. Validação método de análise.....	17
1.3.2.1. Seletividade .....	17
1.3.2.2. Linearidade .....	18
1.3.2.3. Sensibilidade.....	18
1.3.2.3.1. Cartas de Controlo .....	18
1.3.2.4. Limite de Quantificação.....	19
1.3.2.5. Precisão .....	19
1.3.2.6. Exatidão .....	20
2. Parte Experimental .....	21
2.1. Amostragem .....	21

2.1.1.	Bacalhau salgado seco.....	21
2.1.2.	Bacalhau fresco congelado.....	22
2.2.	Determinações analíticas.....	22
2.2.1.	Mineralização das amostras pelo método de referência: determinação de cinza total. ....	22
2.2.1.1.	Material e equipamento.....	23
2.2.1.2.	Procedimento experimental.....	23
2.2.2.	Determinação do teor total de fósforo. Método espectrofotométrico .....	23
2.2.2.1.	Reagentes.....	24
2.2.2.2.	Material e equipamento.....	25
2.2.2.3.	Procedimento experimental.....	25
2.2.2.4.	Ensaio em branco .....	25
2.2.2.5.	Curva calibração .....	25
2.2.3.	Determinação do teor de humidade. Método de referência.....	26
2.2.3.1.	Material e equipamento.....	26
2.2.3.2.	Reagentes.....	26
2.2.3.3.	Procedimento experimental.....	26
2.2.4.	Estudo da influência da concentração de sal na determinação espectrofotométrica dos fosfatos .....	27
3.	Resultados e Discussão .....	29
3.1.	Quantificação do teor total de fosfatos por Espectrofotometria de absorção molecular .....	29
3.2.	Determinação do teor de humidade pelo método de referência .....	31
3.3.	Avaliação da influência da quantidade de sal na determinação dos fosfatos	33
3.4.	Validação do método .....	34
3.4.1.	Seletividade.....	34
3.4.2.	Linearidade.....	35
3.4.3.	Sensibilidade .....	36
3.4.4.	Limite de Quantificação .....	39
3.4.5.	Precisão .....	40

3.4.6. Exatidão .....	42
4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro .....	43
Bibliografia .....	45
Anexo A - Curvas de calibração do fósforo .....	51
Anexo B – Critérios de aceitação do branco e padrões de controlo e de validação.....	55



## Índice de Figuras

Figura 1.1. Bacalhau do Atlântico [7].....	2
Figura 1.2. Distribuição mundial do <i>habitat</i> do bacalhau [2]. .....	3
Figura 2.1. Amostra de bacalhau seco A) e demolhado B), após homogeneização. ....	21
Figura 2.2. Amostra de bacalhau fresco, após homogeneização. ....	22
Figura 3.1. Teor de fósforo total obtido para 12 amostras de bacalhau demolhado comparativamente com o teor máximo permitido. ....	29
Figura 3.2. Teor de fósforo total obtido 11 amostras de bacalhau seco comparativamente com o teor máximo permitido. ....	30
Figura 3.3. Teor de fósforo total obtido 12 amostras de bacalhau fresco comparativamente com o teor máximo permitido. ....	31
Figura 3.4. Teor médio de humidade no bacalhau demolhado, seco e fresco, respetivamente. ....	32
Figura 3.5. Influência da quantidade de NaCl (0-70 %) no teor médio de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , utilizando os padrões de concentração 10,0, 30,0 e 60,0 µg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /mL. ....	33
Figura 3.6. Taxa de recuperação média do analito (%) obtida para o bacalhau demolhado, seco e fresco, respetivamente. ....	35
Figura 3.7. Carta de controlo relativa aos declives obtidos para 10 curvas de calibração. ....	37
Figura 3.8. Carta de controlo relativa ao padrão de validação de concentração 10,0 µg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /mL. ....	38
Figura 3.9. Carta de controlo relativa ao padrão de controlo de concentração 30,0 µg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /mL. ....	38
Figura 3.10. Carta de controlo relativa ao padrão de validação de concentração 60,0 µg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /mL. ....	39



## Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Classificação taxonómica do bacalhau <i>Gadus morhua</i> [2].....	3
Tabela 1.2. Classe, fórmula química, pH e solubilidade de vários fosfatos [18]. .....	9
Tabela 1.3. Legislação para o uso de polifosfatos em peixe e produtos de pesca, na UE [12].....	12
Tabela 3.1. Coeficientes de correlação obtidos nas curvas de calibração do fósforo (n=10). .....	36
Tabela 3.2. Valores determinados para os padrões equivalentes ao LQ e sua respetiva média, desvio padrão, erro relativo e coeficiente de variação. ....	40
Tabela 3.3. Concentrações dos padrões de 10,0, 30,0 e 60,0 $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ , média, desvio padrão, erro relativo e coeficiente de variação determinados, respetivamente. ....	41
Tabela A.1. Parâmetros das curvas de calibração do fósforo. ....	53
Tabela B.1. Verificação do critério de aceitação do branco. ....	57
Tabela B.2. Verificação do critério de aceitação do padrão de validação de concentração 10,0 $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ . ....	58
Tabela B.3. Verificação do critério de aceitação do padrão de controlo de concentração 30,0 $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ . ....	59
Tabela B.4. Verificação do critério de aceitação do padrão de validação de concentração 60,0 $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ . ....	60



## **Lista de abreviaturas**

AIB - Associação dos Industriais do Bacalhau  
CV - Coeficiente de Variação  
ER - Erro Relativo  
EUA - Estados Unidos da América  
FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura  
GRAS - Geralmente reconhecidos como seguros  
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
IC - Cromatografia Iónica  
IPAC - Instituto Português de Acreditação  
IRMM - Instituto de Materiais e Medições de Referência  
LAI - Linha de Alerta Inferior  
LAS - Linha de Alerta Superior  
LC - Linha central  
LCI - Linha de Controlo Inferior  
LCS - Linha de Controlo Superior  
LQ - Limite de Quantificação  
MRC - Materiais de Referência Certificados  
NIST - Instituto Nacional de Normas e Tecnologia  
OMS - Organização das Nações Unidas  
R - Coeficiente de correlação linear  
RELACRE - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal  
TR - Taxa de Recuperação  
UE - União Europeia  
UV - Ultravioleta



## 1. Introdução

### 1.1. O bacalhau

#### 1.1.1. Breve história

O início da pesca do bacalhau remonta à época dos descobrimentos. Não se sabe exatamente qual a data específica, sabe-se contudo, que esta teve início no século XV, num lugar denominado Terra Nova, ou Terra dos Bacalhaus, onde este peixe era bastante abundante. Assim, todos os anos, os portugueses enviavam uma frota de navios (bacalhoeiros) para esta terra para a pesca do bacalhau. Os navios saíam dos portos de norte a sul do país no mês de Maio para regressarem apenas no mês de Outubro [1].

No início do século XVI, durante o reinado de D. João III (1521-1557), foram estabelecidos direitos alfandegários e redigidos regulamentos para o comércio deste peixe, uma vez que este era considerado um artigo valioso no comércio nacional [2]. Em 1580, devido à perda da independência do país para os espanhóis, a pesca do bacalhau na Terra Nova foi suspensa durante quase três séculos. Surge então, em 1830, a Companhia de Pescarias Lisbonense que tem como objetivo reinstituir a captura do bacalhau [1].

Em 1911 foram enviados aos bancos da Terra Nova 34 navios. Todavia a pesca do bacalhau entrou novamente em declínio, devido à primeira guerra mundial (1914-1918). Anos depois do fim da guerra, Portugal, possuía uma frota de bacalhoeiros com cerca de 65 navios. Estes eram fabricados em madeira, sem o auxílio de motor e o bacalhau era capturado com linha e anzol. Só anos mais tarde (anos 40) é que se começaram a utilizar as denominadas redes de arrasto. Estas redes possibilitavam capturar uma maior quantidade de peixe, sem a necessidade de recolha diária.

O bacalhau é conhecido, entre os pescadores, como o peixe “tolo”, pois segundo relatos dos mesmos, este apressa-se para o anzol ou outro objeto cintilante com avidez, e depois de preso não realiza nenhum esforço para se libertar [1].

Passados quase seis séculos, o bacalhau continua a fazer parte da dieta diária dos portugueses. Este é conhecido por muitos como o “fiel amigo”. Tal deve-se ao facto de os portugueses poderem sempre contar com o bacalhau para a execução de uma refeição [3].

#### 1.1.2. Caracterização genérica e taxonómica

A designação bacalhau provém do latim *baccalaure*, cujo significado é bacharel. A classificação *Gadus* tem origem na forma latinizada do grego *gados*, que significa pescado. Por outro lado a denominação *morhua* resulta da forma latinizada *morue*, que por sua vez, advém do celta *mor* (mar) e do latim *lucius* (peixe de água doce) [4].

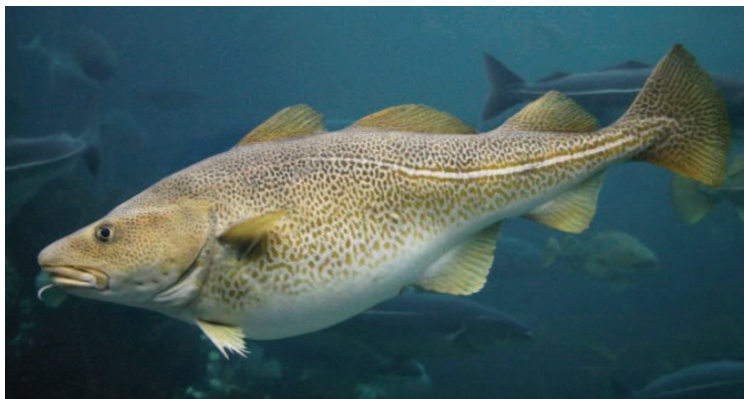
Segundo o Decreto-Lei n.º 25/2005, de 28 de Janeiro [5], são permitidas para comercialização as seguintes denominações de bacalhau:

- ✓ Bacalhau ou bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*);
- ✓ Bacalhau da Gronelândia (*Gadus ogac*);
- ✓ Bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

As restantes espécies são consideradas como espécies afins do bacalhau, entre as quais se destacam a Abrótea e o Paloco, muitas vezes confundidos com o bacalhau.

Em Portugal são permitidas para venda três espécies de bacalhau, sendo que a espécie mais comercializada é a *Gadus morhua*, também dominada como bacalhau do Atlântico. Este peixe possui baixo teor de gordura, o que possibilita a sua conservação em sal e posterior secagem ao sol, no entanto este método já não é frequentemente utilizado [2]. O bacalhau do Atlântico apresenta uma cor acastanhada ou esverdeada (figura 1.1.), podendo exibir manchas negras de forma redonda, entretanto a sua coloração pode adaptar-se conforme o seu tipo de habitat [6].

A espécie de bacalhau *Gadus morhua* possui uma taxa de crescimento elevada, crescendo as fêmeas mais rapidamente que os machos. Após três anos de vida, estes peixes podem atingir os 56 cm de comprimento para os machos e 59 cm para as fêmeas. Aos cinco anos podem ter 81 cm e 85 cm, respetivamente. De referir que o período normal de vida deste peixe é de cerca de dez anos, podendo viver até aos 20 anos [6].



**Figura 1.1. Bacalhau do Atlântico [7].**

O bacalhau vive nas águas frias do Hemisfério Norte, deslocando-se em cardumes desde a Terra Nova até à Islândia e Noruega. Porém, é nas águas a noroeste do Atlântico que se encontram as maiores concentrações deste peixe, mais precisamente na Gronelândia, costa norte americana e Terra Nova. Relativamente à Europa, o bacalhau é bastante abundante na Islândia, Noruega, Mar de *Barents*, Mar branco, Mar báltico e Mar do norte (figura 1.2) [6].

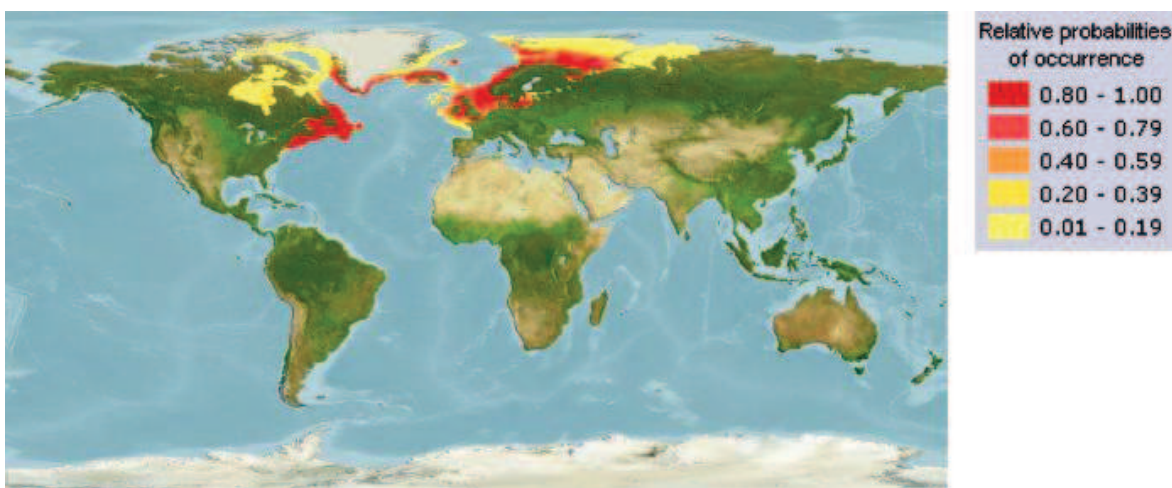


Figura 1.2. Distribuição mundial do *habitat* do bacalhau [2].

O bacalhau apresenta inúmeras espécies e subespécies, no que diz respeito à sua classificação taxonómica. Na tabela 1.1. está demonstrada a classificação relativa ao bacalhau do Atlântico.

Tabela 1.1. Classificação taxonómica do bacalhau *Gadus morhua* [2].

Filo	<i>Chordata</i>
Espécie	<i>Vertebrata</i>
Género	<i>Gnathostomata</i>
Subfamília	<i>Osteichthyes</i>
Família	<i>Achoanichthyes</i>
Ordem	<i>Actinopterygii</i>
Subclasse	<i>Teleostei</i>
Classe	<i>Gadiformes</i>
Série	<i>Gadidae</i>
Superclasse	<i>Gadini</i>
Ramo	<i>Gadus</i>
Subfilo	<b><i>Gadus morhua</i></b>

### 1.1.3. Processo de cura

O processo de cura do bacalhau possui quatro fases fundamentais: lavagem, salga, secagem e maturação/envelhecimento [8].

Na lavagem, o bacalhau é limpo com água salubre abundante, removendo-se os excedentes das vísceras e coágulos de sangue resultantes da sangria e evisceração do peixe e assim sucessivamente [9].

A salga consiste na conservação do bacalhau pela ação do sal e é realizada imediatamente a seguir à lavagem. A utilização do sal possui uma dupla função: desidratação do peixe por diferença de pressão osmótica entre o meio externo e o interno e penetração na carne para diminuição da atividade da água. Nesta etapa o bacalhau é empilhado em camadas uniformes e alternadas de peixe e sal (cerca de 0,33 kg de sal/ kg de peixe), em caixas de madeira ou sobre estrados, com perda da salmoura para o exterior, durante aproximadamente um mês [8]. Este período que o bacalhau fica em contacto com o sal irá proporcionar uma cura eficaz e uniforme, que concede ao peixe o gosto e textura característicos do produto final. O processo denomina-se portanto de salga seca ou salga livre [9].

Seguidamente o peixe possui uma fase de maturação. Esta é mais ou menos demorada (no mínimo trinta dias) e realiza-se por ação de enzimas digestivas e tecidulares, podendo igualmente atuar enzimas de origem microbiana. Estes dois tipos de enzimas contribuem para um aumento gradual de aminoácidos livres, fazendo com que o peixe obtenha o seu sabor tradicional [2].

Por fim realiza-se a secagem. Esta operação consiste na extração de água dos tecidos do peixe e contribui para a manutenção da qualidade do produto. O objetivo da secagem é a remoção de água até se atingir um grau de humidade igual ou inferior a 47 %, e pode realizar-se por dois métodos, natural ou artificial [8].

No método natural o bacalhau é exposto ao sol e vento, sempre que a qualidade do ar ambiente o permita. Este é colocado de manhã em contacto com o sol e recolhido ao final do dia, num processo contínuo, até à obtenção do grau de humidade pretendido ( $\leq 47\%$ ) [8].

No método artificial o peixe é disposto em tabuleiros, que depois são introduzidos num túnel de secagem, em ambiente com temperatura e humidade controladas. Esta operação dura entre 2 a 4 dias (dependendo do tamanho e espessura do peixe) e é realizada em descontínuo, com períodos de repouso [9]. A secagem artificial terá o mesmo objetivo que a secagem natural, todavia como esta apresenta algumas vantagens económicas é, em muitos países, utilizada mais frequentemente que a secagem natural [2].

## 1.2. Introdução dos polifosfatos como aditivo alimentar

### 1.2.1. Atualidade

Segundo a Diretiva 89/107/CEE, de 21 de Dezembro de 1988 [10], entende-se por aditivo alimentar “qualquer substância não consumida habitualmente como alimento em si mesmo e habitualmente não utilizada como ingrediente característico na alimentação, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos géneros alimentícios, com um objetivo tecnológico, na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios.”

A União Europeia (UE) controla o uso de aditivos no processamento de alimentos através de legislação própria, à qual Portugal e os restantes membros têm que se reger. Na legislação europeia, os aditivos encontram-se listados e divididos por grupos de acordo com a função que desempenham nos alimentos, estando igualmente indicado o teor máximo autorizado para cada um deles. Existe uma denominação para cada aditivo atribuindo-se a letra E e um número de 3 ou 4 algarismos. Para a obtenção da autorização de determinada substância como aditivo alimentar, é necessário provar a sua inocuidade para a saúde humana. Para tal é indispensável a realização de estudos toxicológicos e a demonstração da sua necessidade tecnológica, efetuada por autoridades reconhecidas. Qualquer aditivo pode ser sujeito a uma reavaliação se surgirem incertezas relativamente à segurança para a saúde do consumidor [11].

Os polifosfatos são empregues, como aditivos alimentares, numa elevada diversidade de produtos assim como em vários processos industriais. O seu uso como anticongelante, suplemento mineral na alimentação animal, emulsionante, estabilizador de cor e de textura, controlo de pH, são alguns dos exemplos de aplicação [12].

Os polifosfatos são aditivos bastante utilizados no processamento de pescado, pois promovem uma melhoria da retenção de água, reduzindo a perda desta durante o processo de descongelamento. Sabe-se igualmente que a retenção de água no filete de peixe leva a um aumento do peso do mesmo [13]. Apesar de serem permitidos em alguns produtos de pesca, a aplicação de polifosfatos no processo de cura do bacalhau é estritamente proibido pela legislação europeia [12].

Um dos principais desafios que os produtores de bacalhau salgado se deparam é a cor amarela que o produto final apresenta. O peixe sem qualquer tipo de tratamento apresenta uma cor branca, sem coloração visível, contudo, tal é modificado durante as várias etapas do processamento. Nas primeiras etapas do processo não é observada qualquer alteração da cor, mas após a etapa da salga começam a surgir manchas castanho-amareladas que

rapidamente aumentam de tamanho e intensidade durante o armazenamento [13]. A oxidação dos lípidos e proteínas presentes no músculo do bacalhau levam a um aumento progressivo da cor amarela, originando um produto de cor mais escura. Esta mudança de cor provoca uma diminuição da qualidade comercial do produto.

Os efeitos positivos dos polifosfatos na cor e qualidade comercial do peixe salgado são provenientes da oxidação reduzida, a qual está relacionada com efeitos de sequestração dos metais presentes no sal utilizado no processo de salga. Os polifosfatos não possuem um efeito de branqueamento, ou seja, não melhoram a qualidade dos produtos onde se realiza a oxidação da cor [14].

Além da prevenirem a oxidação da gordura do bacalhau, os polifosfatos, promovem o aumento da capacidade de retenção da água no peixe. Tal facto pode ser utilizado para aumentar o rendimento do mesmo, uma vez que ao reter maior quantidade de água o peixe liberta menor quantidade de líquidos durante o armazenamento. Isto trará um benefício na economia do peso do peixe, prevenindo igualmente a libertação da salmoura para o meio ambiente durante o armazenamento, transporte e venda [12].

Com tudo isto os produtores de bacalhau da Islândia, Noruega e Dinamarca efetuaram um pedido às autoridades da UE (primavera de 2011) para a aprovação da utilização dos polifosfatos como aditivo alimentar no processo de salga húmida do bacalhau, com um conteúdo em sal de pelo menos 18 %, para obtenção de um peixe mais claro, mais espesso e com sabor menos intenso.

### **1.2.2. Posição dos industriais Portugueses e Governo Português**

A Associação dos Industriais do Bacalhau (AIB) é um dos muitos organismos portugueses contra a proposta dos produtores do Norte da Europa. Segundo esta associação, a introdução dos polifosfatos no processo de salga do bacalhau será desastrosa para os produtores portugueses, pois implica um aumento dos custos energéticos do processo, uma vez que estes dificultam a extração da água do peixe.

Como referido anteriormente, em Portugal é obrigatório a obtenção de um produto com humidade  $\leq$  a 47 %, obrigação esta que não abrange os produtores noruegueses, islandeses e dinamarqueses que podem adquirir um produto com uma percentagem superior a 50 %. A dificuldade acrescida na extração da humidade do bacalhau, devido à introdução dos polifosfatos ao processo de cura, tem como consequência o alargamento do período de secagem do mesmo, o que implica um processo mais longo. Estes fatores contribuem para a desigualdade existente entre os transformadores de bacalhau, tornando o produto final mais caro para a indústria e para o consumidor. Esta problemática já causou tanta controvérsia que alguns produtores portugueses acreditam mesmo que a

sobrevivência das várias empresas do sector se encontram em risco de fechar portas, contribuindo para o aumento do número de desempregados no país.

Outra consequência do aumento da capacidade de retenção de água será o incremento do peso do bacalhau. Outra justificação para o impedimento da proposta norueguesa/islandesa/dinamarquesa é a incerteza quanto ao efeito dos polifosfatos no produto final. A AIB acredita que estes não trazem qualquer benefício, quer a nível nutricional, quer a nível de qualidade do produto, e levantam ainda a dúvida quanto ao efeito dos polifosfatos na saúde dos consumidores.

O bacalhau português é um produto tradicional e 100 % natural, sem adição de químicos e com características únicas, e como tal os industriais portugueses não vêm qualquer tipo de vantagem na modificação do seu processo de cura, uma vez que este irá provocar alterações significativas nas suas características como a cor, consistência, cheiro e paladar.

Uma vez que as preocupações da AIB são partilhadas pelo governo português, os deputados portugueses do Parlamento Europeu dirigiram uma carta ao comissário europeu das pescas, John Dalli, na qual exprimiram a sua indignação. Nesta carta os eurodeputados constataam que «a Comissão reconhece que há "exposição adicional do consumidor aos polifosfatos", sendo do conhecimento comum que, do ponto de vista científico, e no que diz respeito à saúde dos consumidores, a introdução de polifosfatos está longe de ser pacífica e consensual na comunidade científica, havendo dúvidas expressas pela World Health Organization/WHO e pela Food and Agriculture Organization/FAO no que se refere às funções reconhecidas para este tipo de aditivos em pescado» [15]. Para além desta problemática, também foi debatido no conteúdo da carta as restantes preocupações relatadas anteriormente, por parte da AIB.

Os subscritores da proposta justificam que o produto, no qual ocorrerá a utilização dos polifosfatos, é destinado a outros mercados que não o português, nomeadamente o mercado espanhol e grego.

Embora os esforços do governo português e da AIB para que a proposta dos países nórdicos fosse recusada, tal não se verificou. A decisão final, apesar dos sucessivos adiamentos, foi tomada no início do mês de Julho. No entanto, foram asseguradas algumas medidas compensatórias exigidas pelo governo português no decorrer das negociações.

Entre outras medidas, destacam-se o adiamento do período de adaptação de 1 de Setembro para 31 de Dezembro de 2013, a monitorização do processo por parte da Comissão e o controlo analítico para a determinação dos polifosfatos. Simultaneamente foram reconhecidas oficialmente as especificidades do bacalhau tradicional português, da indústria processadora e do mercado nacional. Porém a conquista mais significativa terá sido a existência da dupla etiquetagem, ou seja, obrigação de referência à presença ou não

de fosfatos na rotulagem. Este facto para além de ser inédito na Europa é específico unicamente para o bacalhau.

Assim, a partir de Janeiro de 2014 será possível encontrar à venda bacalhau onde se utilizou fosfatos no processo de preparação.

### 1.2.3. Classificação dos fosfatos

Os fosfatos derivam da neutralização do ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) com iões de metais alcalinos como o sódio, potássio e cálcio ou então resultam da refinação do fosfato de cálcio. Existem duas classes destes compostos: ortofosfatos e fosfatos condensados (figura 1.3.). Os primeiros, os ortofosfatos ou fosfatos simples, possuem uma estrutura simples, que consiste num átomo de fósforo rodeado por quatro átomos de oxigénio [16]. Estes são mais abundantes e mais estáveis, razão pela qual são os únicos fosfatos encontrados na natureza [17].

Por sua vez, os fosfatos condensados são obtidos por calcinação dos ortofosfatos. Deste processo resultam compostos de cadeia linear e compostos cíclicos (metafosfatos ou ciclofosfatos). Os compostos de cadeia linear compreendem na sua classe os pirofosfatos, os tripolifosfatos e os polifosfatos. Os pirofosfatos e os tripolifosfatos são constituídos por materiais cristalinos e os polifosfatos formam partículas amorfas e vítreas [18].

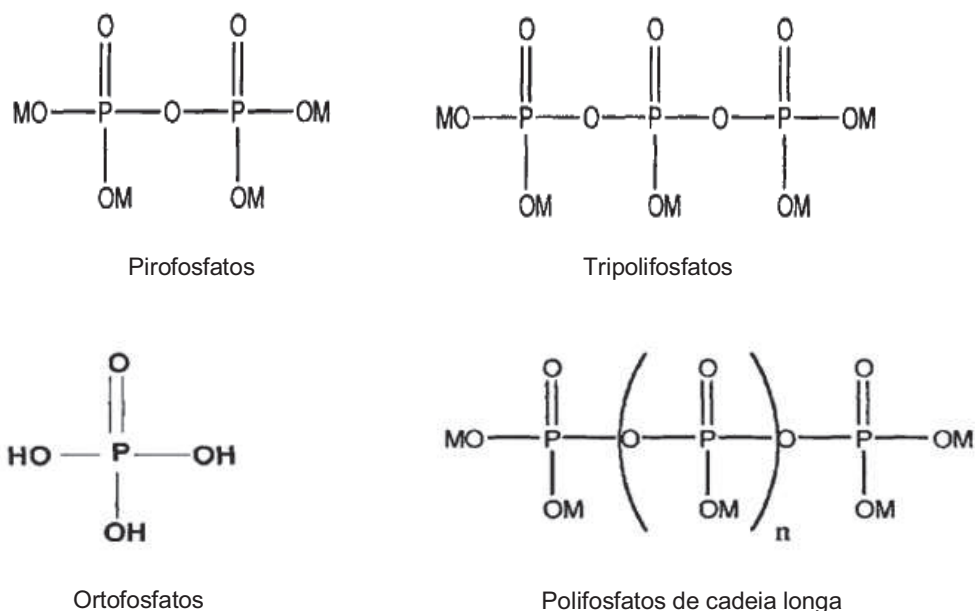


Figura 1.3. Estrutura química das várias classes de fosfatos [18].

Seguidamente, na tabela 1.2., são apresentados diversos compostos pertencentes à classe dos fosfatos e a sua respetiva fórmula química, pH e solubilidade.

**Tabela 1.2. Classe, fórmula química, pH e solubilidade de vários fosfatos [18].**

Classe de fosfatos	Nome do fosfato	Fórmula química	pH <sup>#</sup>	Solubilidade <sup>§</sup> (g/100 g água)
<b>Ortofosfatos</b>	Fosfato monossódico	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	4.6	87
	Fosfato dissódico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	9.2	12
	Fosfato dissódico dihidratado	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.9	15
	Fosfato trissódico	$\text{Na}_3\text{PO}_4$	11.8	14
	Fosfato monopotássico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4.6	25
	Fosfato dipotássico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	9.3	168
	Fosfato tripotássico	$\text{K}_3\text{PO}_4$	11.9	107
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.8	-
<b>Pirofosfatos</b>	Pirofosfato ácido de sódio	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	4.3	15
	Pirofosfato tetrassódico	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	10	3.8
	Pirofosfato tetrapotássico	$\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$	10.5	187
<b>Tripolifosfatos</b>	Tripolifosfato de sódio	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	9.9	15
	Tripolifosfato de potássio	$\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	9.6	193
<b>Polifosfatos de cadeia longa</b>	Polifosfato de sódio	$(\text{NaPO}_3)_{13}\text{Na}_2\text{O}$	7.7	40
	Sal de Graham	$(\text{NaPO})_{21}\text{Na}_2\text{O}$	6.9	-
	Cadeia longa	$(\text{NaPO})_5\text{Na}_2\text{O}$	6.3	-
<b>Metafosfatos</b>	Trimetafosfato de sódio	$(\text{NaPO}_3)_3$	6.7	23
	Tetrametafosfato de sódio	$(\text{NaPO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	6.2	18

<sup>#</sup> Medição do pH para uma solução a 1 %

<sup>§</sup> Medição da solubilidade a 25 °C

#### 1.2.4. Propriedades físico-químicas dos polifosfatos

- **Grau de polimerização**

Os polifosfatos podem ser formados por desidratação dos ortofosfatos a altas temperaturas. Os seus aniões são constituídos por cadeias para as quais cada átomo de fósforo está ligado aos seus vizinhos por dois átomos de oxigénio, originando uma estrutura linear e não ramificada como se pode observar pela figura 1.3. [19].

Estes compostos possuem a fórmula geral:  $M_{(n+2)}P_nO_{(3n+1)}$ , onde n representa o grau de polimerização, podendo assumir valores desde 2 até  $10^6$ . À medida que o grau de polimerização aumenta, a composição do polifosfatos vai-se aproximando da composição dos ciclofosfatos. [20] O que talvez possa explicar, razão de até algum tempo atrás, dominar ideia de que estes dois compostos eram equivalentes [19]. Hoje em dia a nomenclatura metafosfatos é apenas utilizada quando se referencia compostos cíclicos [21].

- **Estabilidade**

Os polifosfatos têm uma grande tendência para reverter para os congéneres mais estáveis. Alguns destes compostos possuem um tempo de vida útil bastante longo, ao passo que outros realizam a sua hidrólise para ortofosfatos de forma mais rápida.

A estabilidade dos polifosfatos é influenciada pela temperatura e pelo pH do meio. A hidrólise destes compostos é favorecida, em soluções aquosas, por altas temperaturas e baixo pH, por outro lado a sua estabilidade é promovida por baixas temperaturas e pH próximo da neutralidade [12].

- **Comportamento em soluções**

Em soluções do tipo aquosas e com força iónica baixa, os polifosfatos formam complexos com outros polímeros, entre os quais se destacam as proteínas, polipéptidos básicos e ácidos nucleicos. Quanto maior for o comprimento da cadeia da molécula de polifosfato, mais elevada é esta capacidade [19].

- **Toxicidade**

Em relação à toxicidade oral, dérmica e inalação os fosfatos inorgânicos exibem uma toxicidade muito baixa pelas três vias de exposição. Pensa-se que a exposição sistémica aos polifosfatos devido à utilização de produtos de consumo seja bastante inferior à exposição sistémica devido à utilização de aditivos alimentares. Assim, é improvável que os seres humanos sofram efeitos adversos devido à adição destes compostos aos alimentos, desde que o consumo diário de fósforo seja inferior a 70 mg/kg/dia.

A principal preocupação associada a produtos que contêm fosfatos inorgânicos são os efeitos que estes causam nos olhos e na pele. Portanto, é importante determinar a irritação dos olhos e da pele originada por estes compostos [22].

### **1.2.5. Aplicação dos polifosfatos como aditivo alimentar**

Os fosfatos são um elemento natural em todos os seres vivos, estando por isso, presentes em quase todos os alimentos. Estes são ainda largamente utilizados como aditivos alimentares nas mais diversas indústrias, como por exemplo a indústria do leite pasteurizado e esterilizado sem sabor, manteiga, gelo comestível, produtos de ovos e especialmente no processo de queijo e de carne. São igualmente utilizados na indústria do marisco e do pescado, com o objetivo de reter humidade e o sabor natural, inibir a oxidação dos lípidos, estabilização da cor e prolongamento do tempo de vida útil do produto [16]. Nos produtos à base de carne, estes compostos são utilizados para redução de perdas de água durante a cozedura, retardamento da decomposição oxidativa, desenvolvimento de cor e como antimicrobianos [21].

Sempre que são usados como aditivos os fosfatos interagem com a superfície do produto. Existe uma grande variedade de processos de adição dos polifosfatos. A concentração exata desta e o tempo de tratamento dependem da espécie de pescado a tratar, todavia o tratamento é mais eficiente logo após a captura, devendo ser realizado antes de qualquer tratamento térmico.

As soluções, que contêm entre 2 a 10 % de fosfatos, podem ser adicionadas aos produtos por diferentes vias de aplicação [23]. As aplicações mais frequentemente utilizadas na indústria são:

- ✓ imersão: 3 % de solução;
- ✓ lavagem: 2-6 % de solução, durante 20 minutos;
- ✓ pulverização: 5-10 % de solução;
- ✓ injeção: 5-8 % de solução;
- ✓ adição a seco: 0,3-0,5 % para sistemas de carne picada;
- ✓ vitrificação: 5 % de solução [16].

Por fim pode-se afirmar que é vasta a aplicação dos fosfatos nas mais variadas indústrias, contudo, esta tem de ser aplicada criteriosamente. O uso incorreto ou até mesmo abusivo pode levar a falhas sensoriais, além de contribuir para situações de fraude económica [23].

### 1.2.6. Legislação em vigor

A legislação que regula o uso de polifosfatos em produtos de pesca varia de país para país. Nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá não existe um limite específico para a aplicação destes compostos no peixe. Segundo o Código de Regulamentos Federais dos EUA, os polifosfatos tem a designação de GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros) quando utilizados de acordo com Boas Práticas de Fabricação.

Por outro lado a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura), comissão do Codex Alimentarius da Organização das Nações Unidas (OMS), é mais flexível pois permite uma utilização máxima até 10 g/kg peixe [23].

Na UE, a quantidade autorizada é de apenas 5 g/kg peixe (tabela 1.3.). A atual legislação em vigor que controla o uso de aditivos alimentares encontra-se estendida ao Regulamento n.º 1333/2008 de 16 de Dezembro de 2008 [24] que revoga a Diretiva 95/2/CE de 20 de Fevereiro de 1995 [25]. A Diretiva em questão aborda todas as questões referentes à utilização de aditivos nos alimentos, desde básicas definições a critérios processuais e de rotulagem [12].

O Regulamento n.º 257/2010 de 25 de Março [26] estabelece um programa de reavaliação dos aditivos alimentares aprovados na Diretiva 95/2/CE. Ainda segundo este Regulamento a reavaliação dos aditivos deverá ser concluída até 31 de Dezembro de 2018, com maior prioridade para certos grupos de aditivos entre os quais se destacam os E450-452 di-, tri- e polifosfatos.

**Tabela 1.3. Legislação para o uso de polifosfatos em peixe e produtos de pesca, na UE [12].**

Código E	Nome do aditivo	Produto alimentar	Teor máximo (mg/kg)	Restrições
E 338-452	Ácido fosfórico Fosfatos (di-tri) Polifosfatos	Peixe não processado	5000	Apenas para filetes de peixe congelados.
		Molúsculos não processados e crustáceos	5000	Apenas para filetes de peixe congelados.
		Peixe processado e produtos de pesca incluindo molúsculos e crustáceos	1000	Apenas produtos enlatados de crustáceos. Surimi e produtos similares
			5000	Apenas peixe, pasta de crustáceos e moluscos congelados e ultracongelados

### **1.3. Quantificação dos polifosfatos**

#### **1.3.1. Métodos de análise**

Existem vários métodos possíveis para quantificar os fosfatos. Estes incluem a Espectrometria de absorção atômica, Volumetria, Eletroforese capilar, Cromatografia iónica (IC), Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), Espectrofotometria com injeção por fluxo e Espectrometria de absorção molecular no UV-Visível. A quantificação do teor de fosfatos no bacalhau é habitualmente realizada por análise espectrofotométrica de absorção molecular no UV-Visível [27].

##### **1.3.1.1. HPLC**

Haberer e Brandes [28] relatam um estudo sobre a determinação de fosfatos solúveis por HPLC com fase inversa. Este envolve a passagem de uma fase líquida polar móvel através de uma fase estacionária não polar sólida. Os compostos dissolvidos com uma afinidade para as moléculas não polares estacionárias são retidas no interior da coluna.

O azul de molibdénio pode ser extraído para certas matrizes não polares como o isobutanol. Este método baseia-se na afinidade do complexo azul de molibdénio com estas fases estacionárias não polares. O complexo adsorvido é, em seguida, transferido como um pico concentrado utilizando acetona como fase móvel. O corante tem uma maior afinidade para a acetona do que qualquer fase estacionária.

O uso do HPLC com fase inversa tem como vantagem sobre a Espectrofotometria o facto de reduzir o volume de amostra (1 mL ou menos) com uma elevada sensibilidade, precisão e potencial automação, não requerendo passos adicionais de pré-concentração e/ou extração dos fosfatos para baixos limites de deteção. A precisão dos dados depende de um controlo preciso das condições da cromatografia como a taxa de fluxo, temperatura, tempo de reação e do volume de amostra injetada, daí a automatização deste método ser importante. Esta irá melhorar repetibilidade do método assim como reduzir a contaminação das amostras, aumentando o rendimento destas.

O tipo de colunas utilizadas e a simplicidade dos solventes é de grande utilidade para outros métodos estabelecidos, tal como a análise de nitratos, pois permite a utilização deste equipamento para vários métodos, para além da determinação dos fosfatos. No entanto este método possuiu a desvantagem de requerer um equipamento caro, tornando difícil a sua aquisição pela maioria dos laboratórios [28].

##### **1.3.1.2. Cromatografia iónica**

A Cromatografia iónica é considerada por muitos autores, como um método eficaz na determinação simultânea de várias espécies (ortofosfatos, pirofosfatos e trifosfatos) de

fosfatos. Isto deve-se a uma boa separação entre os picos resultantes da análise, preparação relativamente simples da amostra e ainda a um curto tempo de análise [29].

Iammarino e Di Taranto [30] desenvolveram um método analítico para a quantificação de polifosfatos em produtos de origem animal, o qual foi posteriormente validado. Este método teve como base a Cromatografia iónica com deteção condutimétrica, no qual as separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna de troca iónica e um eluente constituído por um gradiente de hidróxido de sódio (NaOH). O método desenvolvido requer um tratamento mínimo da amostra e permite a determinação direta dos polifosfatos. A validação do método foi realizada de acordo com o Regulamento 882/2004/CE [31] e a Decisão 657/2002/CE [32], que descrevem os parâmetros analíticos necessários para validar a fiabilidade do método. Estes parâmetros são a linearidade, especificidade, precisão, recuperação, deteção e limites de quantificação. A capacidade de discriminação do método entre amostras tratadas daquelas não tratadas com polifosfatos foi verificada pela análise de amostras comerciais contendo este composto [30].

Sekiguchia *et al.* [33] relatam um problema associado ao uso do hidróxido de sódio contendo 15 % de metanol como eluente. Apesar de este método ser simples de realizar e poder ser empregue na determinação dos polifosfatos, possuiu alguns problemas práticos como por exemplo a complexa preparação do NaOH puro, possibilidade de contaminação pelo carbonato, problemas de segurança associados ao uso de altas concentrações de NaOH como eluente e a reduzida sensibilidade após a adição do metanol ao NaOH.

De modo a prevenir estes problemas foi desenvolvido um sistema de geração de eluente automatizado, que produz um eluente de hidróxido de potássio (KOH) altamente puro. O uso deste gerador automatizado origina maior reprodutibilidade dos tempos de retenção, melhor precisão do método e limites de deteção inferiores para os analitos em análise [33].

Nguyen *et al.* [29] realizaram um estudo sobre a degradação dos fosfatos adicionados ao músculo do bacalhau utilizando a cromatografia iónica e o método espectrofotométrico de absorção molecular. Neste estudo foram obtidos valores mais baixos de fósforo total pelo método cromatográfico comparativamente ao método espectrofotométrico. Isto pode estar relacionado com o facto de a Cromatografia iónica conseguir identificar e quantificar a forma exata dos fosfatos, já a Espectrofotometria apenas possibilita determinar todo o conteúdo de fósforo, incluindo os fosfatos naturais no músculo do peixe e os adicionados. Os autores concluíram igualmente que os pirofosfatos e os trifosfatos adicionados foram parcialmente degradados, ao longo do processo, a ortofosfatos o que contribui para o aumento do teor destes, indicando a necessidade de realização de novo estudo para a otimização da preparação da amostra [29].

### 1.3.1.3. Espectrofotometria de absorção molecular no UV-Visível

A Espectrofotometria de absorção molecular no UV-Visível é um método amplamente utilizado na análise quantitativa e consiste na medição da absorção da radiação UV e visível por determinada espécie presente numa solução [34]. A base matemática para as análises quantitativas é a lei de Beer-Lambert (equação 1.1.). Esta lei relaciona a fração de radiação absorvida com a concentração do analito em estudo, e fundamentada pela seguinte equação:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1.1.)$$

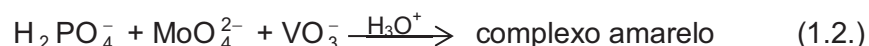
Onde:

- A - absorvância do meio que traduz a intensidade da cor da solução;
- $\epsilon$  - coeficiente de absorção molar (ou absorvidade molar), expressa em  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ;
- c - concentração do analito na solução, expressa em mol/L;
- l - espessura do meio, expresso em cm [35].

A absorvidade é um parâmetro específico para cada molécula e depende do comprimento de onda. Por outras palavras é uma constante para um composto particular, num solvente particular, com um determinado comprimento de onda e que pode apresentar diferentes valores numéricos, dependendo da concentração e espessura do meio [34].

A determinação dos fosfatos por Espectrofotometria de absorção molecular tem como fundamento o método padrão de quantificação do fósforo total. Este método consiste na hidrólise dos fosfatos a ortofosfatos, seguida da medição espectrofotométrica da cor amarela obtida pela reação destes compostos com uma solução de molibdato-vanadato [12]. A preparação da amostra baseia-se na decomposição dos polifosfatos a ortofosfatos na presença de ácido sulfúrico ou ácido tricloroacético. Os ortofosfatos vão então reagir com o molibdato de amónio e com o vanadato de amónio, numa solução de ácido nítrico, formando-se um precipitado amarelo, o complexo ácido vanadomolibdofosfórico (equação 1.2.) [14]. A cor formada é proporcional à concentração de fósforo [16].

A reação que ocorre entre os iões de fosfato e os iões de molibdato/vanadato é a seguinte:



Ao longo dos anos foram realizadas diversas modificações ao método padrão. Estas alterações proporcionam maior sensibilidade e precisão dos resultados e um maior comprimento de onda ótimo de deteção. O método verde malaquita baseado na formação de um complexo verde de molibdofosfato, em meio ácido, é um deles. No entanto, a reação

é bastante lenta e a absorção pode continuar a desenvolver-se durante várias horas, o que acarreta dificuldades na execução do método [14].

Outro exemplo de modificações realizadas ao método padrão é o método azul de molibdénio. Na presença de agentes redutores, o molibdénio amarelo é reduzido ao complexo molibdénio azul. Este possui uma forte absorção de luz, maior do que o método padrão, e a absorção máxima ocorre para comprimentos de onda maiores. Estas vantagens proporcionam uma elevada sensibilidade do método e menor interferência dos iões coexistentes. São vários os agentes redutores que podem ser utilizados neste método. Jastrzębska [36] testou os efeitos de três agentes redutores (ácido ascórbico, sulfato de hidrazina e hidroquinona agrupada com sulfato de hidrazina) quanto ao limite de deteção, precisão e exatidão do método. O uso de hidroquinona sulfato de hidrazina demonstrou ser o processo mais adequado, dado que os resultados mostraram repetibilidade e precisão razoável comparativamente com os obtidos com os outros dois agentes [36].

Todavia, a redução deve ser efetuada sob condições cuidadosamente controladas devido à natureza instável do corante azul e do agente redutor [37].

Os difosfatos, trifosfatos e polifosfatos são encontrados na matriz em análise devido à sua utilização como aditivos alimentares, por outro lado os ortofosfatos para além de existirem naturalmente no bacalhau também podem ter a mesma origem que estes. A quantificação do teor de fosfatos, pelo método espectrofotométrico, permite determinar não só aqueles provenientes do processamento industrial, mas também os de origem natural

Assim, dos métodos mencionados anteriormente, este foi o escolhido para a realização desta dissertação [12]. Tal deve-se ao facto de este ser um método simples e fácil de executar, com baixos custos associados, e que pode ser realizado na maioria dos laboratórios. Outra razão será a existência de extensa literatura, sobre esta problemática, na qual o método de análise utilizado para determinar os polifosfatos é o método escolhido, mesmo que seja aplicado para outras matrizes alimentares.

Como referido previamente, existem vários métodos analíticos para a determinação dos polifosfatos em várias matrizes alimentares. No entanto, nenhum deles foi desenvolvido como método de referência na matriz pescado. O objetivo desta dissertação foi a validação de um método de análise para a quantificação dos polifosfatos no bacalhau, de acordo com o método de referência espectrofotométrico descrito na norma NP 4495: 2010.

Foi igualmente determinado o teor de humidade, uma vez que a introdução destes compostos no processo de cura do bacalhau dificulta a extração da humidade do peixe.

Por fim foi realizado um estudo sobre a influência da concentração de cloreto de sódio na quantificação espectrofotométrica dos fosfatos. Este estudo teve como objetivo de determinar possíveis interferências do NaCl na eficiência do método de determinação de polifosfatos.

### 1.3.2. Validação método de análise

A validação de um método de análise é um tema de extrema importância para os laboratórios dado a necessidade de desenvolver sistemas que assegurem a qualidade.

Existem várias definições descritas na literatura para validação logo conclui-se que este é um termo não-específico [38]. Entretanto segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025 [39], validação de um método analítico representa a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos de uma dada utilização pretendida são satisfeitos.

Neste sentido, a validação tem como objetivo demonstrar que o procedimento analítico é adequado ao uso pretendido, conferindo uma garantia de qualidade operacional e de desempenho analítico [40].

Os parâmetros mínimos de desempenho do método, necessários avaliar, são os seguintes: seletividade, linearidade, limite de quantificação, sensibilidade, precisão e exatidão.

#### 1.3.2.1. Seletividade

A seletividade é definida como a capacidade do método em identificar exata e especificamente determinado analito presença de outros compostos da matriz, sem a interferência destes. Esta pode ser avaliada por recurso a ensaios de recuperação [41].

Os ensaios de recuperação do analito consistem na fortificação da amostra, ou seja, na adição de soluções de diferentes concentrações deste em proporções conhecidas e ao longo da gama de trabalho. O método é considerado seletivo se forem apurados limites de aceitação para os ensaios de recuperação entre 85 % e 115 % [42].

A taxa de recuperação (TR) é calculada segundo:

$$TR \% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (1.3.)$$

Onde:

$C_1$  - concentração após a adição da quantidade conhecida de analito, expressa em  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ ;

$C_2$  - concentração antes da adição da quantidade conhecida de analito, expressa em  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ ;

$C_3$  - concentração conhecida de analito adicionada à amostra, expressa em  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ .

### **1.3.2.2. Linearidade**

A linearidade é a capacidade do método em gerar resultados que são linearmente proporcionais à concentração do analito em estudo, dentro de um intervalo especificado [43].

Este parâmetro pode ser avaliado pela análise do coeficiente de correlação (R) da curva dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito. O coeficiente de correlação, dependendo da técnica analítica, deve apresentar um valor igual ou superior a 0,995 de modo a obter-se uma boa linearidade dos resultados [44].

### **1.3.2.3. Sensibilidade**

A sensibilidade indica a variação da resposta em função da concentração do analito, isto é, avalia se o método consegue identificar, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Esta depende da natureza do analito e da técnica de deteção usada [41].

Na prática, a sensibilidade representa a derivada de primeira ordem da curva de calibração em determinada zona de concentração. Sempre que a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa reta de calibração [42].

O termo sensibilidade é usualmente confundido com o limite de deteção. Porém é necessário referir que o primeiro conceito é relativo à capacidade de resposta do analito e o segundo corresponde à menor concentração detetada pelo método [40].

Este parâmetro pode ser apresentado sob a forma de cartas de controlo. Estas cartas são habitualmente usadas para a aceitação dos valores de declive e detetar tendências que ocorram durante a realização dos ensaios, permitindo o controlo da qualidade dos resultados.

#### **1.3.2.3.1. Cartas de Controlo**

As cartas de controlo são gráficos que permitem detetar possíveis irregularidades que possam ocorrer durante a execução do método, sendo de extrema utilidade se forem elaboradas com um objetivo concreto como por exemplo para o controlo de equipamentos automáticos, validação de calibrações e controlo da precisão e exatidão da técnica. Para a elaboração destas cartas podem-se utilizar uma grande variedade de materiais, tais como: padrões certificados, materiais de referência certificados (MRC), materiais de referência internos e duplicados da mesma amostra ou de amostras diferentes, entre outros [45].

Existe uma enorme variedade de tipos de cartas de controlo, das quais se destacam as cartas de médias ou de indivíduos. Estas representam ao longo do tempo um determinado

parâmetro ou uma média em função do teor. Apesar das cartas de controlo individuais serem mais simples de construir, são menos sensíveis que as de médias. Outra vantagem da aplicação das cartas de controlo de médias provém do Teorema do Limite Central, pelo qual a distribuição dos valores médios tende a seguir a Distribuição Normal, mesmo que a população individual não o faça [46].

Para a elaboração de uma carta de médias ou indivíduos, é necessário determinar o valor médio e o desvio-padrão correspondentes a pelo menos 10 ensaios. Após a obtenção do valor médio e do respetivo desvio-padrão, começa-se por traçar a carta, representando os pontos correspondentes às análises a controlar em função do número de ensaios realizados [46].

As cartas de controlo possuem um conjunto de linhas de apoio ao operador que permitem verificar se o processo está sob controlo. Existem 5 linhas de apoio: a linha central (LC) que corresponde à média das leituras efetuadas, duas linhas de alerta, uma superior e outra inferior (LAS e LAI), definidas a partir da LC:  $LC+2s$  e  $LC-2s$ , em que  $s$  representa o desvio padrão das leituras. Por fim temos as linhas de controlo superior (LCS) e inferior (LCI) que são igualmente definidas pela LC à qual se acresce  $3s$  e subtrai  $3s$ , respetivamente [45].

#### **1.3.2.4. Limite de Quantificação**

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração medida para a qual é possível quantificar o do analito, em determinadas condições operativas [44]. Por norma, se a curva de calibração se encontrar perfeitamente definida este parâmetro corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, com exceção do branco.

Após a determinação do LQ, deve ser verificado se a exatidão e precisão são satisfatórias. Tal é efetuado pela determinação de vários padrões, com concentração próxima ou igual ao limiar de quantificação para os quais se determina o erro relativo (ER) e o coeficiente de variação (CV) [40]. Segundo indicações do IPAC (Instituto Português de Acreditação) os parâmetros anteriormente citados devem ser iguais ou inferiores a 10 % [47].

#### **1.3.2.5. Precisão**

A precisão avalia o grau de proximidade entre os resultados de ensaios realizados pelo mesmo método sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões. Esta geralmente calcula-se sob a forma de desvio padrão, variância ou coeficiente de variação. [43] É importante referir que a precisão varia com a concentração do analito logo deve ser determinada para diferentes gamas de concentração [41].

A duas medidas mais comuns para expressar a precisão são a repetibilidade e a reprodutibilidade. A repetibilidade é a dispersão dos resultados obtidos para diferentes ensaios efetuados sob as mesmas condições de operação, isto é, refere-se aos ensaios realizados sobre a mesma amostra e no mesmo laboratório, no qual se utiliza igual: procedimento, analista, equipamento e reagentes, num curto intervalo de tempo.

A reprodutibilidade refere-se ao uso do mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra, em diferentes condições (diferentes operadores, equipamentos, época, etc) [42].

#### **1.3.2.6. Exatidão**

A exatidão estima o grau de concordância entre o valor obtido e o valor de referência aceite convencionalmente como esperado ou verdadeiro [43]. Esta pode ser estudada por meio de ensaios interlaboratoriais ou uso de materiais de referência certificados (MRC). Relativamente aos ensaios interlaboratoriais, existem diversos tipos, como por exemplo os ensaios de aptidão e de normalização. Se o objetivo for avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade de determinado método então utiliza-se o ensaio do tipo normalização. Por outro lado se o objetivo for evidenciar a exatidão dos seus resultados, recorre-se a ensaios do tipo de aptidão [42].

Os MRC são muitos utilizados no processo de validação de métodos de análise. Para isso, os materiais são sujeitos ao tratamento das amostras e analisados pelo método a validar, comparando os valores obtidos com o valor do certificado [44]. OS MRC possuem valores de concentração (ou outra grandeza) para cada parâmetro e uma incerteza associada assim o seu fornecimento deve ser realizado por organismos reconhecidos e credíveis, como por exemplo o NIST (Instituto Nacional de Normas e Tecnologia) ou o IRMM (Instituto de Materiais e Medições de Referência) [41].

## 2. Parte Experimental

### 2.1. Amostragem

Para a realização do trabalho experimental foram utilizadas amostras de bacalhau salgado seco recolhidas de dois peixes pertencentes a diferentes lotes. Foram igualmente usadas amostras de bacalhau fresco congelado referentes a dois peixes de lotes distintos.

As amostras foram adquiridas em diferentes pontos de revenda deste produto, entre os meses de Maio e Julho de 2013.

#### 2.1.1. Bacalhau salgado seco

As amostras de bacalhau seco foram divididas em duas porções. A primeira porção (figura 2.1 B) foi colocada num recipiente com água durante 48 horas para a obtenção de filetes de peixe reidratados com um teor de sal de cerca de 1 %. A proporção água/peixe utilizada na demolha da amostra consistia em 1 porção de peixe para 10 porções de água da torneira. A água utilizada foi substituída três vezes por água fresca e com uma frequência de 16 horas [13]. Depois da demolha, a amostra foi sujeita a uma remoção das peles e das espinhas com posterior homogeneização, realizada por uma picadora própria para alimentos.

Após homogeneização, a amostra de bacalhau demolhado foi dividida em várias frações que foram colocadas em sacos plásticos, devidamente identificados, e congeladas numa arca congeladora da marca Martins e Azevedo-Cofri CHG (classe 1) a  $-20 \pm 5$  °C para a evitar degradação da amostra.

Na segunda porção (figura 2.1. A), começou-se por eliminar o excesso de sal da superfície da amostra. Em seguida retiraram-se as peles e as espinhas e procedeu-se à homogeneização da amostra de igual modo que a primeira parcela.

Depois da homogeneização a amostra foi conservada num recipiente de plástico, à temperatura ambiente.

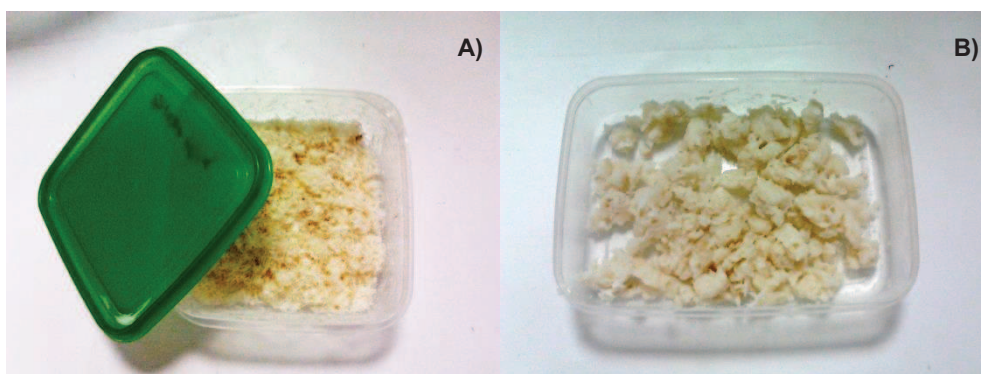


Figura 2.1. Amostra de bacalhau seco A) e demolhado B), após homogeneização.

### **2.1.2. Bacalhau fresco congelado**

As amostras de bacalhau fresco (figura 2.2.) foram descongeladas em ambiente refrigerado, a uma temperatura de  $3 \pm 2$  °C, durante aproximadamente 1/2 dia. Após esta operação o líquido de descongelação foi rejeitado e a amostra foi sujeita ao mesmo procedimento de preparação e homogeneização que as amostras secas e demolhadas.

Seguidamente à homogeneização das amostras, estas foram armazenadas num frigorífico da marca Electrolux, modelo ERC3700, a  $3 \pm 2$  °C até posterior análise.



**Figura 2.2. Amostra de bacalhau fresco, após homogeneização.**

## **2.2. Determinações analíticas**

### **2.2.1. Mineralização das amostras pelo método de referência: determinação de cinza total.**

A mineralização das amostras de bacalhau demolhado, seco e fresco por inceneração foi realizada, respetivamente, ao longo de 12 ensaios e em conformidade com o método referido na NP 1615 Produtos de carne e produtos cárneos: determinação de cinza total [48]. Este método consiste na secagem da amostra, seguida de carbonização e inceneração a uma temperatura de  $525 \pm 25$  °C.

Para além dos 12 ensaios, foram efetuados 2 ensaios extra para cada tipo de bacalhau (demolhado e seco), de acordo com a norma NP 2032 Produtos de pesca e de aquicultura: determinação do teor de cinza total [49]. Estes ensaios suplementares foram executados com o objetivo de averiguar diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos dado que estes diferem entre si na quantidade de amostra utilizada e no tempo de secagem na estufa. Porém não se verificou nenhum desvio significativo dos resultados, logo a execução dos restantes ensaios foi realizada de acordo com a norma NP 1615 [48].

### **2.2.1.1. Material e equipamento**

A homogeneização das amostras utilizadas nos ensaios foi efetuada numa picadora da marca Ufesa, modelo Briol Chopping Pd-5310. A pesagem foi executada numa balança analítica da PAG OER LIKON, modelo 80A - 200M, com precisão de 0,0001 g.

O processo de secagem das amostras foi realizado numa estufa de secagem da marca Binder, modelo FD115, regulável a  $103 \pm 1$  °C.

As amostras foram colocadas em cadinhos de porcelana e carbonizadas na mufla da marca Lenton Furnaces, a uma temperatura de  $525 \pm 5$  °C, para mineralização total das amostras.

### **2.2.1.2. Procedimento experimental**

Inicialmente os cadinhos foram colocados na mufla a  $525 \pm 25$  °C, durante 20 minutos. De seguida estes foram arrefecidos em exsiccador à temperatura ambiente e pesados, com aproximação de 0,0001 g. Pesou-se cerca 2 g de amostra para cada cadinho e depois estes foram transferidos para estufa de secagem regulada a  $103 \pm 1$  °C, durante cerca de 1 hora.

Após secagem a amostra foi disposta numa placa elétrica e aquecida progressivamente até carbonização da mesma. Seguidamente transferiu-se os cadinhos com a amostra para a mufla pré-regulada a  $525 \pm 25$  °C, durante 4 horas. Por fim deixou-se arrefecer os cadinhos no exsiccador até à temperatura ambiente e pesou-se com aproximação de 0,0001 g.

### **2.2.2. Determinação do teor total de fósforo. Método espectrofotométrico**

Inicialmente o teor total de fósforo foi determinado de acordo com o método descrito na NP 1842: Carnes e produtos cárneos: determinação do teor total de fósforo [50]. Este método é baseado na hidrólise da cinza em ácido nítrico, seguida da filtração e diluição da amostra. De seguida adiciona-se uma mistura de monovanadato de amónio e heptamolibdato de amónio em meio ácido, originando uma solução de cor amarela. Por fim realiza-se a medição espectrofotométrica da cor a  $430 \pm 2$  nm.

A quantificação do teor de fósforo foi realizada ao longo de 12 ensaios em amostras de bacalhau demolido e fresco e 11 ensaios em amostras de bacalhau seco. Os ensaios referentes ao bacalhau demolido e seco foram efetuados em triplicado, e para o bacalhau fresco foram realizados em duplicado.

A duplicação (ou triplicação) das amostras não garante por si só maior exatidão do resultado final, isto é, se existir erro sistemático então ambos os duplicados (ou triplicados) irão possuir este tipo de irregularidade. No entanto, se ocorrer algum erro acidental apenas num dos duplicados, o valor médio terá uma menor erro. Logo, o uso de duplicados deve ser

utilizado para a deteção de eventuais erros em novas amostras ou amostras de difícil homogeneização, e para o controlo da repetibilidade [46].

Os teores médios dos duplicados/triplicados de fósforo obtidos durante os ensaios para o bacalhau demolido, seco e fresco encontram-se apresentados nos Resultados e Discussão, sob formato de cartas de controlo.

Durante o desenvolvimento desta dissertação foi realizada a validação da norma NP 4495: Produtos de pesca e de aquicultura: determinação do teor total de fósforo [51]. O laboratório onde foram realizados os ensaios tinha a validação da determinação do teor total do fosforo em produtos de carne (NP 1842 -1). Deste modo foram executados 4 ensaios adicionais, 2 ensaios para o bacalhau demolido e 2 ensaios para o bacalhau seco, ambos executados em duplicado, utilizando esta nova norma.

Como não foram verificados desvios significativos nos resultados obtidos experimentalmente a determinação dos fosfatos foi realizada pela norma NP 1842 [50]. O método de determinação utilizado nas duas normas é equivalente, deferindo entre si apenas na quantidade de amostra e no procedimento aplicado na dissolução das cinzas.

A norma NP 4495 [51] refere que a repetibilidade de dois ensaios paralelos não deve ser superior a 0,2 g  $P_2O_5$  / kg amostra contudo no laboratório onde foram realizados os ensaios (Equilibrium) o critério de aceitação de duplicados/triplicados é de 10 %, ou seja, 0,1 g  $P_2O_5$  / kg. No decorrer deste trabalho experimental, apenas 10 ensaios para o bacalhau demolido e 7 ensaios para o bacalhau seco cumprem o critério de aceitação de 10 % entre amostras duplicadas/triplicadas. A satisfação deste requisito de qualidade é indispensável para a validação dos resultados [39].

#### **2.2.2.1. Reagentes**

Para preparar a solução de ácido nítrico (solução 1) usou-se ácido nítrico 68-70 %, da marca Sharlau Basic.

A solução de monovanadato de amónio de concentração 0,0025 g/cm<sup>3</sup> (solução 2) foi preparada utilizando monovanadato de amónio da marca Merck.

Na preparação da solução 3 foi utilizado heptamolibdato de amónio tetra-hidratado da marca Riedel-de Haën e com concentração próxima de 0,05 g/cm<sup>3</sup>.

Para a obtenção de uma solução padrão-mãe de fosfato ( $C_{P_2O_5}=500$  mg/L) foi empregue dihidrogenofosfato de potássio da marca J.T. Baker e com concentração aproximadamente de  $958,8 \times 10^6$  g/cm<sup>3</sup>.

### 2.2.2.2. Material e equipamento

Na hidrólise da cinza obtida pelo método de determinação de cinza total usou-se um banho de água marca Selecta, modelo Precistern, regulado a uma temperatura de  $100 \pm 5$  °C.

A filtração da amostra foi efetuada usando filtros da marca Advantec com diâmetro de 125 mm.

A quantificação dos fosfatos foi realizada num Espectrofotómetro de absorção molecular UV-1603 da Shimadzu, ao comprimento de onda de  $430 \pm 2$  nm, usando células de vidro da marca Hellma Analytics, com um percurso óptico de 10 mm.

### 2.2.2.3. Procedimento experimental

As cinzas obtidas pelo método de determinação de cinza total foram dissolvidas em 10 mL de ácido nítrico e aquecidas durante 30 minutos em banho de água, regulado a uma temperatura de 100 °C. Em seguida as amostras foram filtradas. Após filtração pipetou-se 20 mL do filtrado límpido quantitativamente para balões volumétricos de 100 mL. Seguidamente foram adicionados 30 mL do reagente colorimétrico e deixou-se em repouso pelo menos durante 15 minutos.

Por fim mediu-se a concentração da solução com a amostra ( $\lambda=430 \pm 2$  nm). Os resultados da concentração são expressos em  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$  e o teor de fósforo total em  $\text{g P}_2\text{O}_5/\text{kg}$  amostra. O teor de fósforo total é calculado pela seguinte equação:

$$W_{\text{P}_2\text{O}_5} = \frac{10 \times c}{20 \times m} \quad (2.1.)$$

Onde:

c - concentração da solução da amostra obtida na curva de calibração, expressa  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ ;

m - massa da toma para análise, expressa em gramas.

### 2.2.2.4. Ensaio em branco

A leitura do branco foi realizada utilizando 2 mL da solução de ácido nítrico (solução 1) e 30 mL do reagente colorimétrico para um balão volumétrico de 100 mL, diluindo até à marca com água.

### 2.2.2.5. Curva calibração

A partir da solução padrão-mãe de fosfato foram elaboradas 6 soluções padrão, com concentrações compreendidas entre 10,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5 /\text{mL}$ . A curva de calibração foi

traçada de acordo com as leituras obtidas das soluções padrão no Espectrofotómetro, corrigidas com o ensaio em branco.

### **2.2.3. Determinação do teor de humidade. Método de referência**

O teor de humidade foi obtido pelo método exposto na NP 1614: Carnes e produtos cárneos: determinação do teor de humidade [52]. A determinação do teor de humidade é definida pela mistura completa da toma para análise com areia e secagem a  $103 \pm 2$  °C até massa constante.

Para este parâmetro foram efetuados 11 ensaios, em duplicado, para amostras de bacalhau demolido e seco e 12 ensaios, em duplicado, para o bacalhau fresco. Destes apenas 10 ensaios para o bacalhau demolido e 9 ensaios para o bacalhau seco cumprem o critério de aceitação de 10 % entre amostras [39].

O teor médio de humidade dos ensaios cujos duplicados se encontram em conformidade com o critério de repetibilidade e os seus respetivos desvios-padrão são apresentados no subcapítulo 3.2.

#### **2.2.3.1. Material e equipamento**

A pesagem das amostras foi executada numa balança analítica da PAG OER LIKON, modelo 80A - 200M e precisão 0,0001 g.

A determinação da humidade foi realizada numa estufa de secagem da marca Binder, modelo FD115, que opera a uma temperatura de  $103 \pm 1$ °C.

#### **2.2.3.2. Reagentes**

Utilizou-se areia da marca Panreac (auxiliar homogeneização da amostra) com as seguintes características: grão fino (0,25-0,30 mm) e  $M=60,09$  g/mol.

#### **2.2.3.3. Procedimento experimental**

Transferiu-se cerca de 15 g de areia tratada juntamente com uma vareta de vidro para o cristalizador. De seguida o conjunto foi à estufa a  $103 \pm 2$  °C, durante pelo menos 30 minutos. Após arrefecimento o cristalizador foi pesado com aproximação de 0,001 g.

Seguidamente transferiu-se uma toma entre 5 a 8 g de amostra para o cristalizador, e este foi novamente pesado. Para a determinação da humidade, a amostra e a areia foram homogeneizadas completamente com auxílio da vareta de vidro e o conjunto colocado na estufa a  $103 \pm 2$  °C, durante pelo menos duas horas.

Por fim deixou-se arrefecer em exsiccador até à temperatura ambiente e pesou-se. O teor humidade, expresso em percentagem de massa, foi posteriormente determinado pela seguinte equação:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (2.2.)$$

Onde:

$m_0$  – massa do conjunto cristizador, areia e vareta, expressa em gramas;

$m_1$  - massa do conjunto cristizador, areia, vareta e toma para análise, antes da secagem, expressa em gramas;

$m_2$  – massa do conjunto cristizador, areia, vareta e toma para análise, após da secagem, expressa em gramas.

#### **2.2.4. Estudo da influência da concentração de sal na determinação espectrofotométrica dos fosfatos**

De forma a avaliar possíveis interferências do teor de sal na eficiência do método espectrofotométrico foi efetuado um estudo no qual se determinou a quantidade de fósforo numa matriz com 1, 5, 20 e 70 % de NaCl.

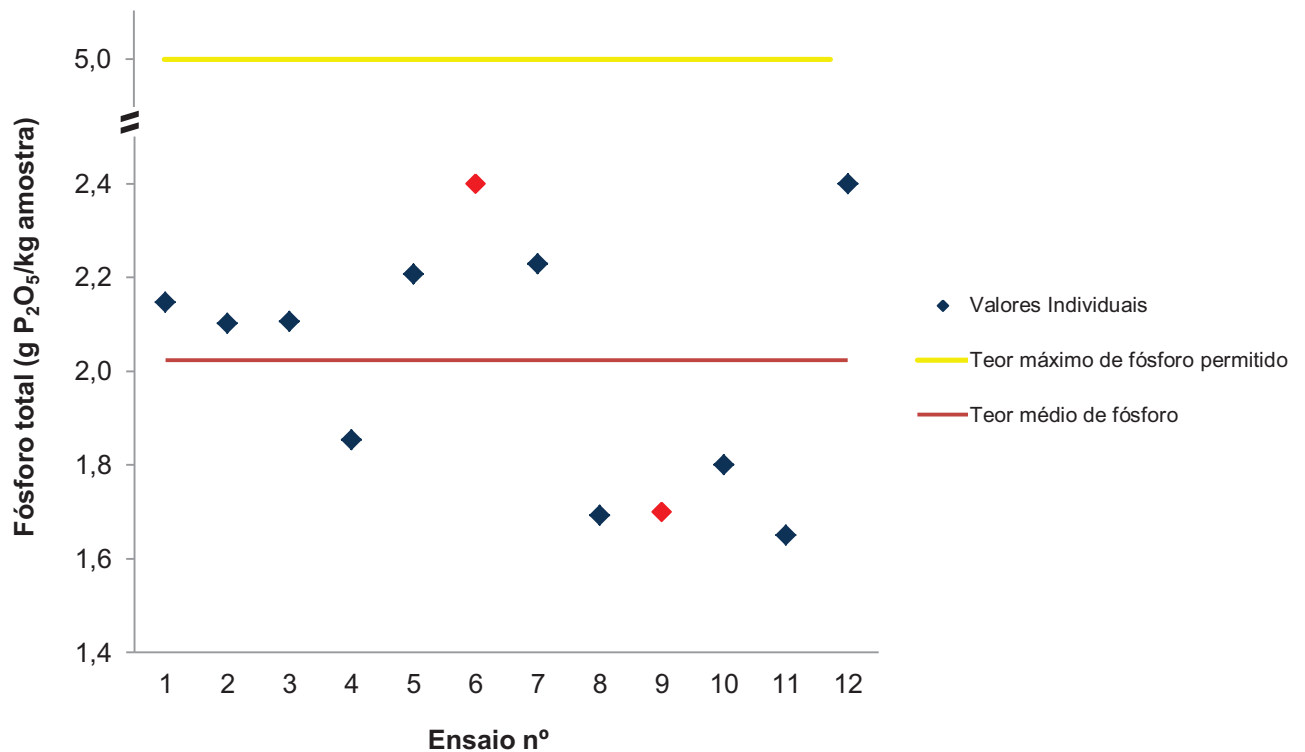
Para a realização deste estudo foi efetuado 1 ensaio em triplicado (com exceção da matriz com 70 % de NaCl, dado que para esta seria necessário uma quantidade elevada de NaCl, cerca de 70 g), no qual se utilizou 3 padrões de diferentes concentrações equivalentes a 10,0, 30,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ . A determinação espectrofotométrica do fósforo foi efetuada conforme o descrito na norma NP 1842, sendo a água desionizada de cada solução padrão substituída pelas várias matrizes de NaCl.



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Quantificação do teor total de fosfatos por Espectrofotometria de absorção molecular

Os resultados obtidos na determinação do teor de fósforo total, para o bacalhau demolido, seco e fresco são apresentados nas figuras 3.1., 3.2. e 3.3., respetivamente.



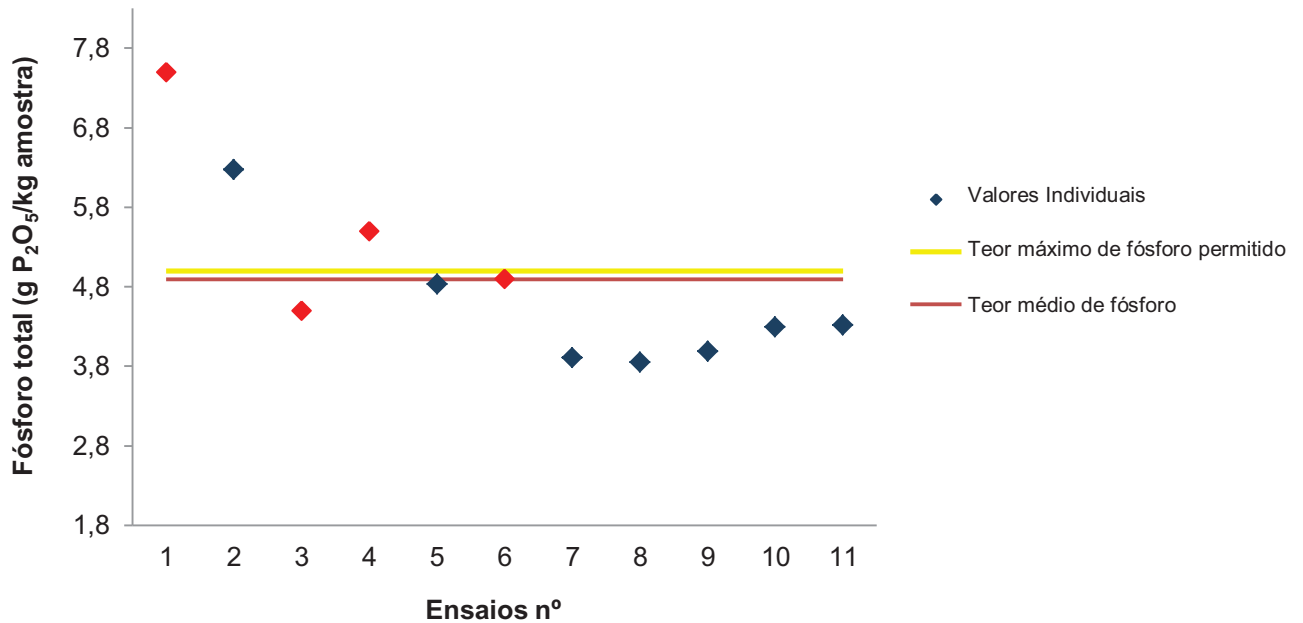
**Figura 3.1. Teor de fósforo total obtido para 12 amostras de bacalhau demolido comparativamente com o teor máximo permitido.**

Através da figura 3.1., verifica-se que a distribuição dos valores em torno do valor médio segue a distribuição Normal (ou de Gauss) logo não existem situações de não conformidade, estando todos os valores dentro das condições impostas. Apesar de não existirem desvios consideráveis ao valor de referência é fundamental mencionar que nem todos os valores presentes na figura 3.1. estão de acordo com o critério de aceitação de 10 % para amostras em triplicado, 2 valores exibidos a cor vermelha (ensaio nº 6 e 9).

É possível ainda observar na figura 3.1. que os valores obtidos experimentalmente são inferiores à quantidade máxima de fosfatos permitida por lei, segundo a Diretiva 95/2/CE para o bacalhau (5 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg peixe) [25].

O teor médio de fósforo obtido para o bacalhau demolido foi de  $2,0 \pm 0,3$  g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg. Este valor é ligeiramente superior ao indicado na literatura para o bacalhau *Gadus morhua*,

que segundo alguns autores (Þórarinsdóttir *et al* [14] e Thorarinsdottir [54]), foi de aproximadamente 1,0 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg.



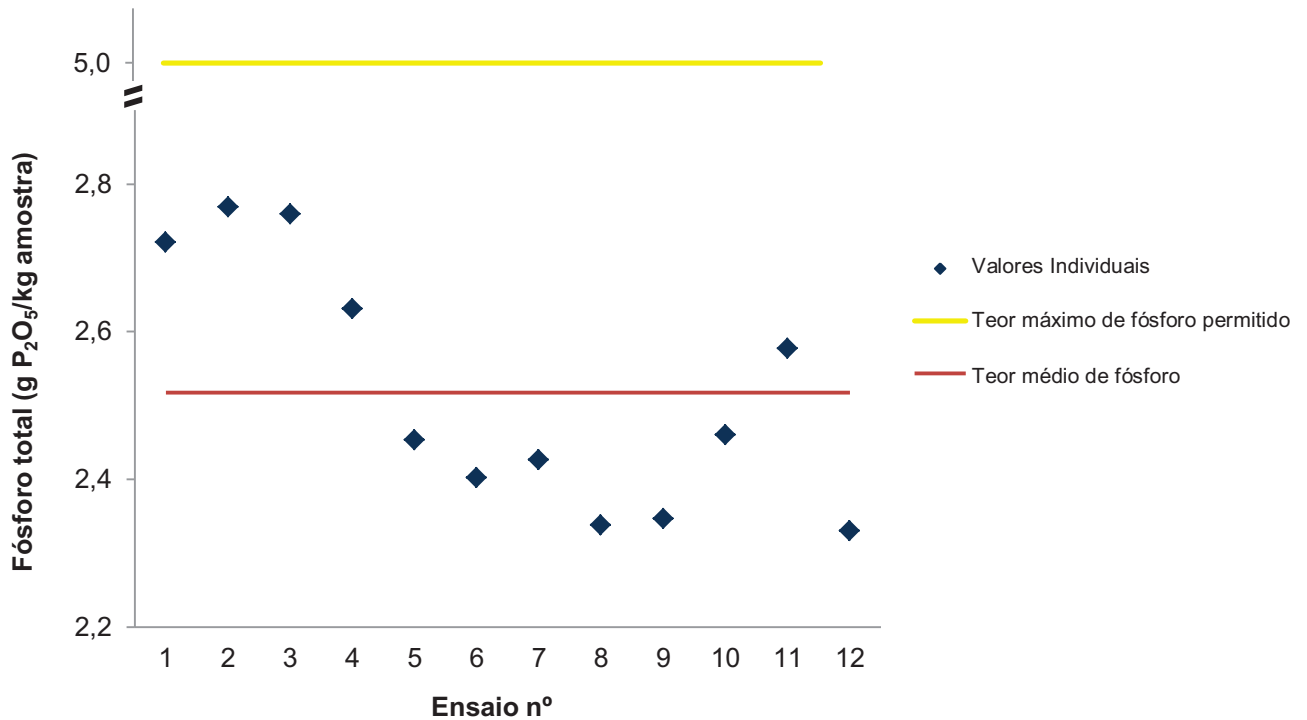
**Figura 3.2. Teor de fósforo total obtido 11 amostras de bacalhau seco comparativamente com o teor máximo permitido.**

Relativamente ao bacalhau seco (figura 3.2.) é possível observar que a dispersão dos valores obtidos experimentalmente em torno do seu valor médio não obedece ao modelo esperado (distribuição de Gauss).

Analogamente ao bacalhau demolido, os 4 valores exibidos a cor vermelha, referentes aos ensaios nº 1, 3, 4 e 6, não cumprem o critério de repetibilidade para amostras em triplicado.

Ainda pela análise da figura 3.2. verifica-se que os ensaios nº 1, 2 e 4 excedem a quantidade máxima de fosfatos permitida na legislação, o que pode ser justificado devido à dificuldade na homogeneização das amostras do bacalhau seco.

Comparativamente com os valores encontrados na literatura, ( $3,4 \pm 0,5$  g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg) o teor médio de fósforo obtido para o bacalhau seco foi significativamente superior ( $4,9 \pm 1,1$  g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg) [14, 54]. Efetivamente, uma parte das amostras estudadas (4 no total) não está de acordo com o critério de repetibilidade, logo se estes valores não forem contabilizados o teor médio de fósforo passará a ser  $4,5 \pm 0,9$  g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg.



**Figura 3.3. Teor de fósforo total obtido 12 amostras de bacalhau fresco comparativamente com o teor máximo permitido.**

Similarmente ao bacalhau demolido, o bacalhau fresco exibe uma distribuição segundo a distribuição de Gauss em torno do valor médio (figura 3.3.).

O critério de repetibilidade é idêntico ao descrito anteriormente para o bacalhau demolido e seco ( $0,1 \text{ g P}_2\text{O}_5/\text{kg}$ ). Neste sentido, a repetibilidade é alcançada na totalidade no que diz respeito aos valores quantificados de fósforo total para este tipo de bacalhau.

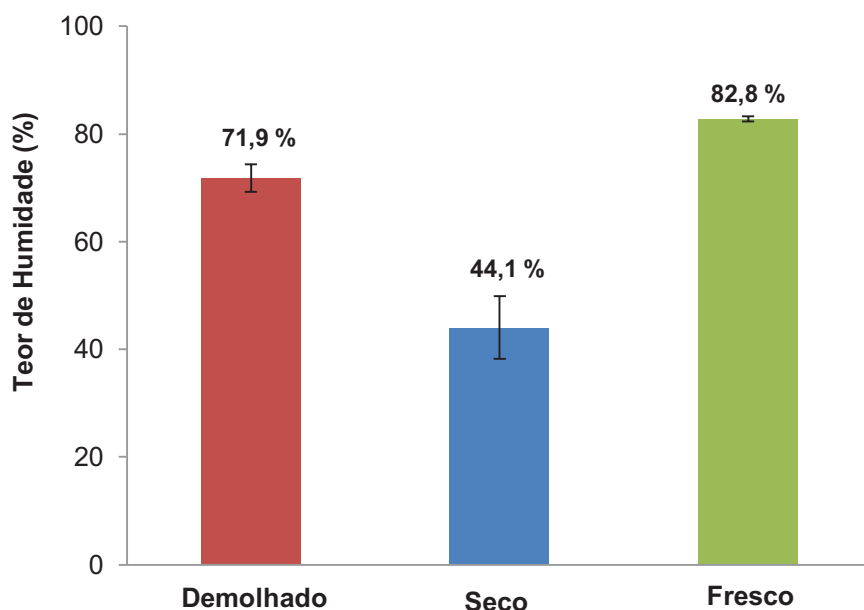
Pórarinsdóttir *et al* [14] e Thorarinsdóttir *et al* [54] referem que o valor médio de fósforo para o bacalhau fresco sem nenhum tipo de tratamento é de  $4,4 \pm 0,4 \text{ g P}_2\text{O}_5/\text{kg}$  e  $4,41 \pm 0,4 \text{ g P}_2\text{O}_5/\text{kg}$ , respetivamente. Assim o valor encontrado para o bacalhau fresco, correspondente a  $2,5 \pm 0,2 \text{ g P}_2\text{O}_5/\text{kg}$  é significativamente inferior aos teores encontrados pelos autores.

### 3.2. Determinação do teor de humidade pelo método de referência

Um dos principais constituintes dos produtos de pesca é a água (66 - 81 %) [53]. Embora varie de acordo com a espécie, esta é o componente mais abundante no músculo do peixe. O teor de humidade para a espécie de bacalhau *Gadus morhua* varia entre os 78 e 83 % [53].

Segundo o Decreto-Lei n.º 25/2005 o bacalhau salgado seco e as suas espécies afins, após lavagem e posterior secagem por evaporação natural ou artificial, devem possuir um teor de humidade igual ou inferior a 47 % [5].

Na figura 3.4, apresentam-se os valores médios de humidade obtidos para as amostras analisadas de bacalhau demolido, seco e fresco.



**Figura 3.4. Teor médio de humidade no bacalhau demolido, seco e fresco, respetivamente.**

O teor médio de humidade obtido para o bacalhau demolido foi de  $71,9 \pm 2,5$  % (figura 3.4.). Como seria de esperar este valor é bastante superior ao valor permitido no Decreto-Lei n.º 25/2005 [5], pois as amostras de bacalhau foram sujeitas a um processo de reidratação. Em contrapartida, comparativamente aos valores encontrados na literatura este teor é um pouco inferior aos  $84,1 \pm 0,7$  % obtidos por Þórarinsdóttir *et al* [14]. A discrepância entre o valor teórico e o obtido experimentalmente pode ser justificada pelo tipo de reidratação efetuada.

Por outro lado, o teor médio de humidade no bacalhau seco foi de  $44,1 \pm 5,9$  % (figura 3.4.). O valor é inferior aos 47 % permitidos por lei, no entanto apresenta um elevado desvio padrão (5,9). Este parâmetro indica a variação dos valores em relação à média, logo quanto maior o desvio padrão, mais dispersos estes valores estão.

As amostras de bacalhau seco correspondem a peixes de diferentes lotes, ou seja, os 4 ensaios iniciais são relativos a um lote e os 5 últimos relativos a outro. Uma vez que os peixes pertencem a lotes diferentes será de esperar que os valores obtidos variem entre si, contribuindo para a dispersão dos resultados, expressa num elevado desvio-padrão. Outra justificação para a variação dos resultados poderá ser a dificuldade da homogeneização das amostras, uma vez que o músculo do peixe se encontra endurecido devido ao processo de salga.

A humidade obtida para o bacalhau seco é bastante inferior ao valor teórico descrito por Þórarinsdóttir *et al* [14] ( $56,6 \pm 0,4$  %). Tal pode ser justificado devido à diferença das fases no processo de cura do bacalhau, como por exemplo o tipo de salga efetuada, o tempo de maturação a que o bacalhau foi sujeito e o processo de secagem utilizado.

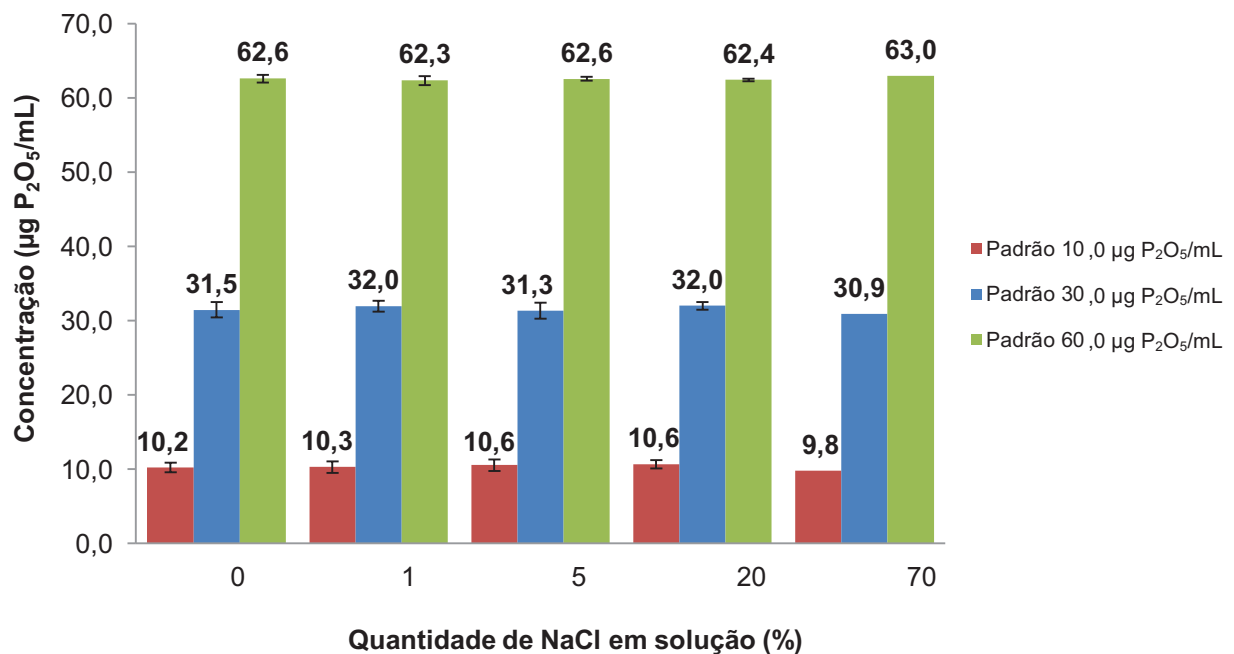
O teor médio de humidade para o bacalhau fresco foi de  $82,8 \pm 0,5$  % (figura 3.4.). Este valor está de acordo com o teor de humidade encontrado na literatura para a espécie de bacalhau *Gadus morhua* ( $81,8 \pm 0,4$  %) [14].

Após a análise dos resultados pode-se afirmar que o teor de humidade varia consoante o tipo de bacalhau e que a sua determinação será mais difícil em amostras de bacalhau seco.

### 3.3. Avaliação da influência da quantidade de sal na determinação dos fosfatos

Adicionalmente à determinação do teor total de fosfatos e do teor de humidade foi igualmente efetuado um estudo sobre a influência do teor de sal na quantificação dos fosfatos.

Os dados referentes ao estudo sobre a influência da quantidade de sal na determinação espectrofotométrica do fósforo encontram-se expostos na seguinte figura:



**Figura 3.5.** Influência da quantidade de NaCl (0-70 %) no teor médio de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, utilizando os padrões de concentração 10,0, 30,0 e 60,0 µg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/mL.

A verificação de interferências do teor de sal na determinação dos fosfatos é efetuada comparando o valor obtido para o padrão com 0 % em NaCl com os restantes padrões com mesma concentração mas em diferentes matrizes (1, 5, 20 e 70 % em NaCl). Esta comparação é realizada para os 3 padrões em estudo (10,0, 30,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ ).

Na figura 3.5. não existem diferenças significativas entre os valores médios das concentrações dos padrões de 10,0, 30,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$  correspondentes a 1, 5, 20 e 70 % em NaCl e 0 % em NaCl, uma vez que se cumpre o critério de aceitação de 10 %.

Portanto é possível afirmar que as concentrações médias obtidas para os 3 padrões de diferente concentração (10,0, 30,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ ) não apresentam variação significativa, ao longo da gama de concentração de NaCl (0-70 %) presente em solução.

É ainda necessário mencionar que devido à elevada quantidade de NaCl para a preparação da solução com 70 % em NaCl, para os três padrões estudados, não foi viável a realização o ensaio em triplicado, tornando impossível determinar o seu desvio padrão (figura 3.5.).

Com tudo isto conclui-se que a quantidade de sal não afeta a quantificação do teor de fosfatos.

### **3.4. Validação do método**

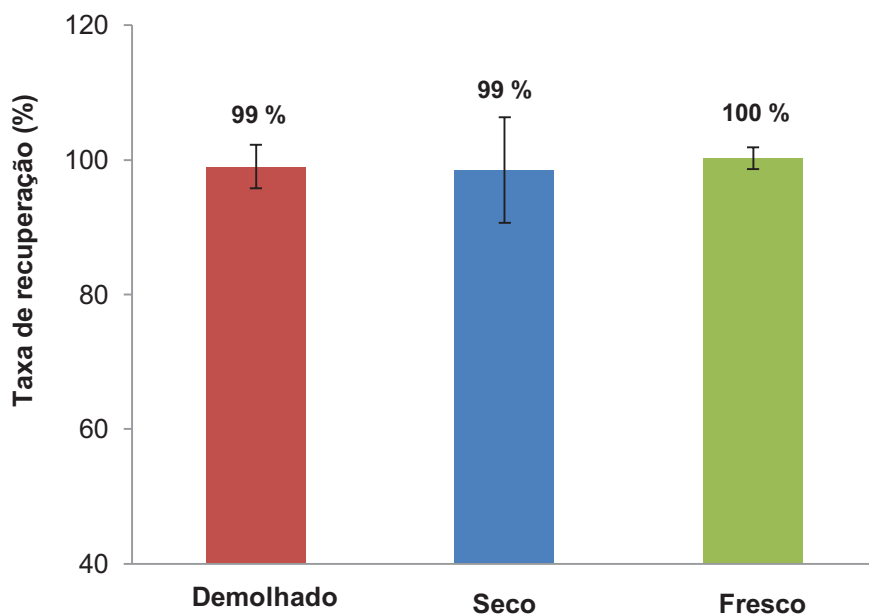
Nos subcapítulos seguintes estão expostos os parâmetros que visam a validação do método espectrofotométrico para a determinação do fósforo total.

É importante referir que esta abordagem é uma entre tantas outras existentes, para a validação de métodos de ensaios. Dependendo do objetivo em estudo e do grau de exigência necessário alguns parâmetros poderão não ser avaliados, porém, é imprescindível o estudo da precisão e da exatidão, exceto para métodos em que o objetivo é apenas qualitativo. De salientar que, mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos, isso não significa que a validação do método não será possível.

#### **3.4.1. Seletividade**

Um método é considerado específico e seletivo quando na prática, e após a realização de ensaios de recuperação, a taxa de recuperação do analito se encontrar entre 85 e 115 % [47].

Na figura 3.6. estão apresentadas as taxas de recuperação médias obtidas para amostras de bacalhau demolido, seco e fresco.



**Figura 3.6. Taxa de recuperação média do analito (%) obtida para o bacalhau demolhado, seco e fresco, respetivamente.**

Através da figura 3.6. consegue-se apurar que a taxa de recuperação do fósforo para o bacalhau demolhado, seco e fresco é de  $99 \pm 3 \%$ ,  $99 \pm 8 \%$  e  $100 \pm 2 \%$ , respetivamente, estando os resultados de acordo com o critério de validação imposto para este parâmetro ( $85 \geq TR \leq 115 \%$ ).

Neste caso verifica-se que o método analítico em estudo é seletivo e que não existem influências da matriz nos resultados obtidos.

### 3.4.2. Linearidade

A linearidade do método em estudo é avaliada pelo traçado de curvas de calibração lineares. Após o traçado de 10 curvas de calibração é possível afirmar que a linearidade do método de análise é verificada se o coeficiente de correlação  $\geq 0,995$  [47].

Seguidamente, na tabela 3.1., são apresentados os coeficientes de correlação referentes às 10 curvas de calibração elaboradas.

**Tabela 3.1. Coeficientes de correlação obtidos nas curvas de calibração do fósforo (n=10).**

Curva de calibração do fósforo nº	Coeficiente de correlação linear (R)
1	0,99986
2	0,99969
3	0,99808
4	0,99997
5	0,99989
6	0,99979
7	0,99988
8	0,99929
9	0,99991
10	0,99995

Pela análise dos dados exibidos na tabela anterior conclui-se que as curvas de calibração realizadas estão de acordo com o critério de linearidade, descrito anteriormente, para o qual o coeficiente de correlação deverá ser igual ou superior a 0,995.

### 3.4.3. Sensibilidade

A verificação da sensibilidade do método é efetuada através da representação de uma carta de controlo construída a partir dos declives de 10 curvas de calibração. Com isto pretende-se detetar flutuações nas calibrações instrumentais e analíticas e na resposta dos equipamentos.

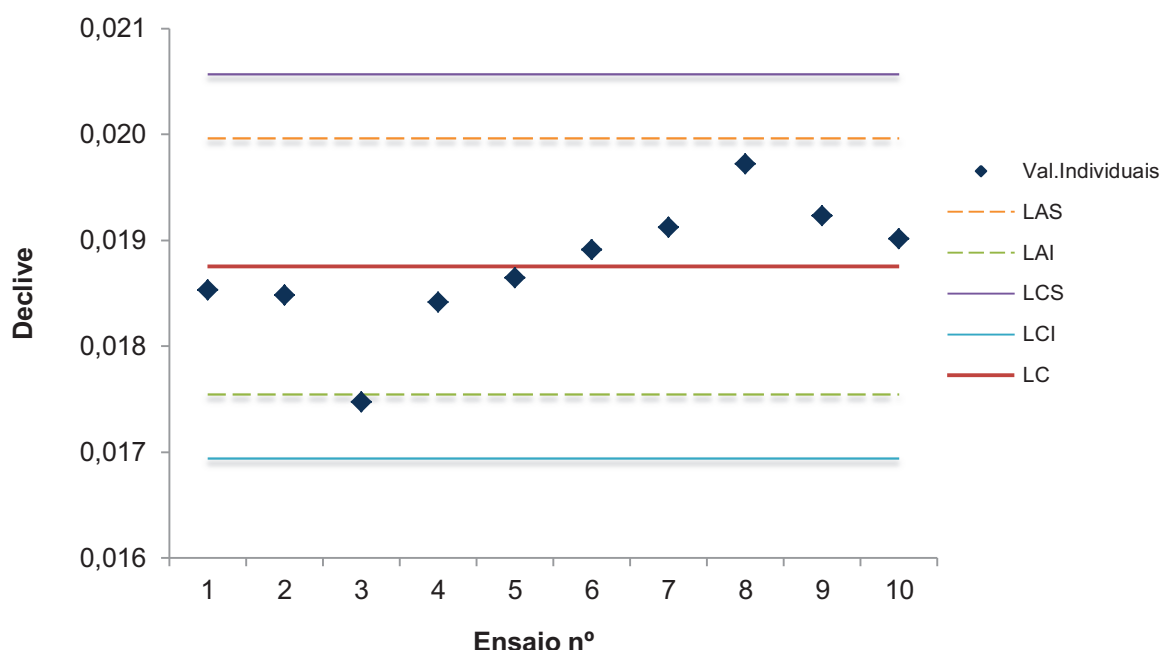
Para o estudo deste parâmetro foram representadas adicionalmente 3 cartas de controlo relativas ao padrão de controlo de concentração 30,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$  e para os padrões de validação de concentração 10,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ .

O padrão de controlo foi obtido a partir de uma solução-mãe de diferente lote da solução utilizada na preparação das soluções padrão utilizadas na validação das curvas de calibração. O objetivo deste padrão será a deteção de erros que ocorrem durante a preparação das amostras, ou seja, averiguar a existência de contaminação das amostras e assegurar a conservação dos reagentes.

Os padrões com concentração de 10,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$  são padrões de verificação, independentes dos de calibração, nos extremos da curva e têm como objetivo o controlo da qualidade e a constatação de desvios na preparação de padrões.

O branco e os padrões de controlo e de validação estão igualmente sujeitos a critérios de aceitação. O padrão de concentração 10,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$  possui um critério de aceitação de 20 % já para os restantes padrões este é de apenas 10 % [47]. Relativamente ao branco, a sua concentração tem de ser igual ou inferior a 1/3 da concentração do padrão de 10,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$  (LQ) [47]. Os dados referentes aos critérios de aceitação para estes parâmetros estão apresentados no Anexo B.

De seguida são apresentadas as cartas de controlo relativas ao declive, padrão de controlo e padrões de validação (figura 3.7 – 3.10.). No Anexo A são apresentadas as gamas de concentração de padrão usadas e respetivas absorvâncias, equação da reta e coeficiente de correlação das diferentes curvas de calibração.



**Figura 3.7. Carta de controlo relativa aos declives obtidos para 10 curvas de calibração.**

A partir da figura 3.7. é observada a inexistência de situações de não conformidade. Apenas um valor (ensaio nº 3) se encontra ligeiramente abaixo da LAI, contudo como é superior à LCI não é considerado como não conformidade. A dispersão dos valores obtidos experimentalmente não satisfaz completamente a distribuição de Gauss, o que justifica a necessidade de realização de ensaios suplementares de modo a verificar a continuidade desta tendência. Embora a dispersão dos valores não seja a mais favorável, não significa que o método não consiga identificar, com certa confiança, duas concentrações próximas.

É possível, então, afirmar que o método em estudo é sensível e que o declive da reta é constante ao longo da gama de trabalho utilizada.

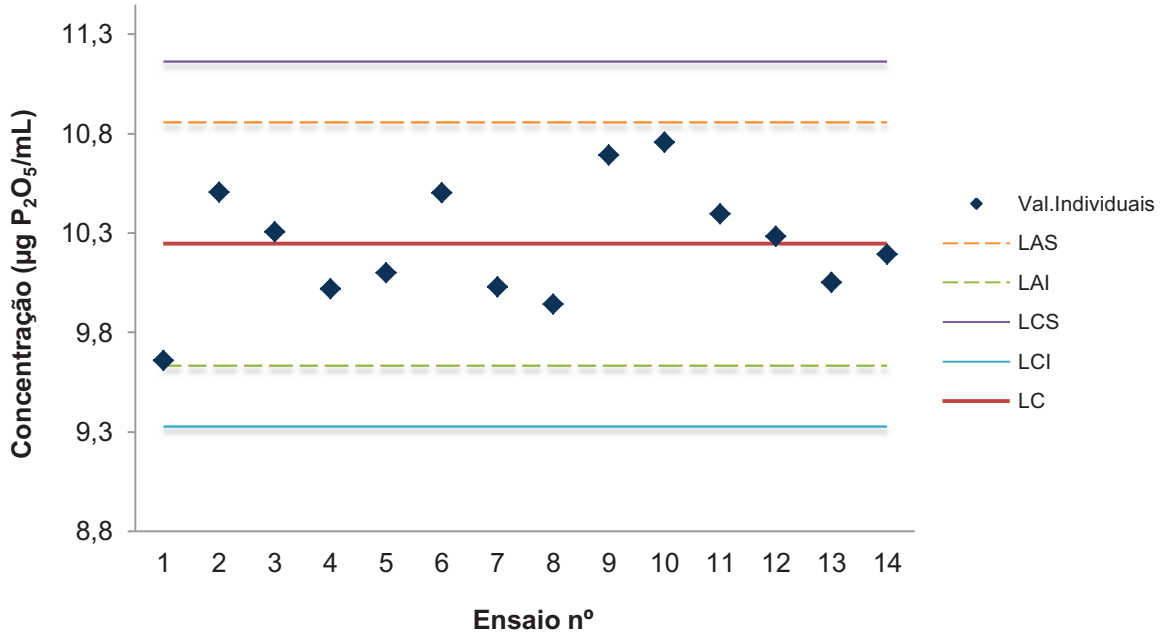


Figura 3.8. Carta de controlo relativa ao padrão de validação de concentração 10,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ .

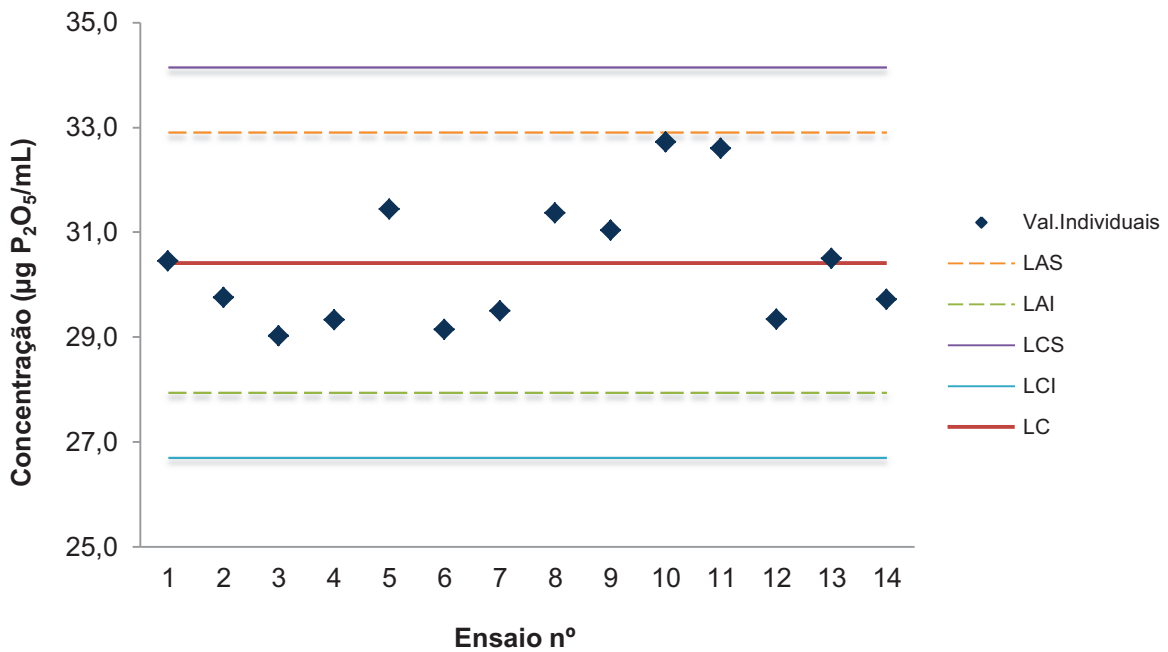
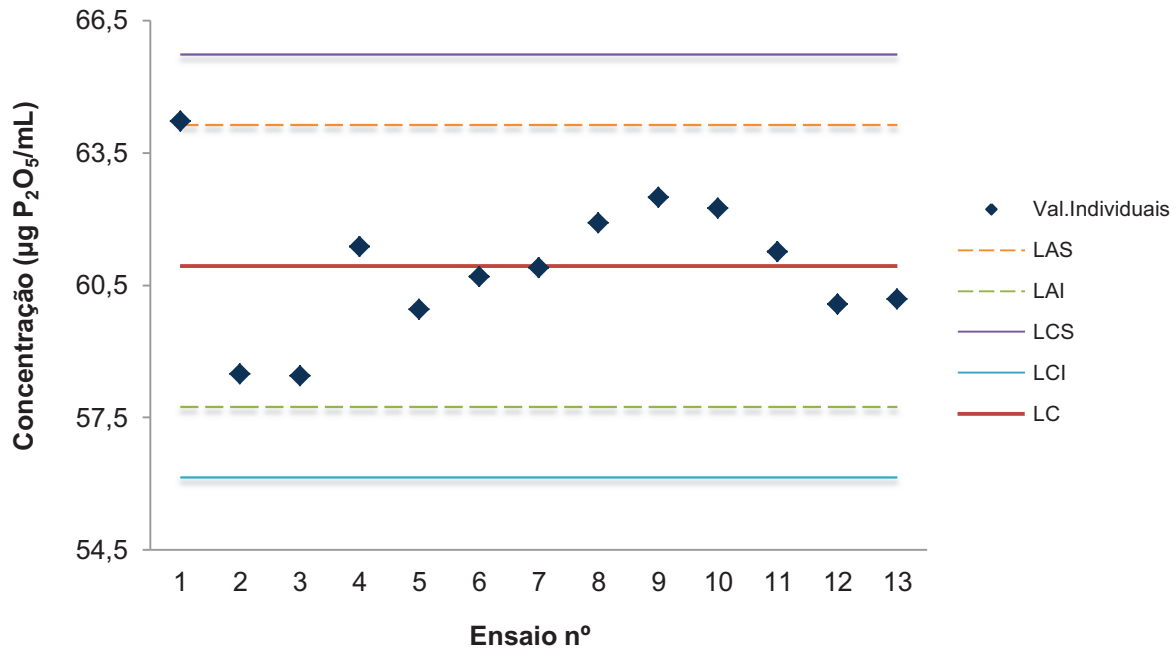


Figura 3.9. Carta de controlo relativa ao padrão de controlo de concentração 30,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ .



**Figura 3.10. Carta de controlo relativa ao padrão de validação de concentração 60,0 µg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/mL.**

Nas figuras 3.8., 3.9. e 3.10. são apresentas as leituras sucessivas das concentrações dos padrões de controlo e de validação. Pela análise destas figuras observa-se que não foram encontradas situações de não conformidade.

Relativamente ao padrão de controlo e ao padrão de validação com concentração de 10,0 µg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/mL, todos os valores permanecem dentro das linhas de alerta, apresentando uma distribuição favorável dos resultados e em concordância com a distribuição Normal. Quanto ao padrão de validação com concentração de 60,0 µg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/mL este apresenta apenas um valor acima da LAS, no entanto similarmente ao declive, este permanece abaixo da LCS. Este padrão exhibe igualmente uma dispersão dos resultados em conformidade com a distribuição de Gauss.

Após esta avaliação constata-se que não existem nem contaminações das amostras, nem deterioração dos reagentes, estando assegurada a qualidade dos resultados assim como o controlo do processo.

#### 3.4.4. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) para o método em discussão equivale ao padrão de calibração de menor concentração, 10,0 µg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/mL. A verificação deste parâmetro de validação foi realizada determinando o valor do LQ para vários padrões internos. De seguida foi calculada a sua média, desvio padrão, erro relativo e coeficiente de variação. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela seguinte.

**Tabela 3.2. Valores determinados para os padrões equivalentes ao LQ e sua respetiva média, desvio padrão, erro relativo e coeficiente de variação.**

Ensaio	LQ ( $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ )
1	9,6
2	10,5
3	10,2
4	10,0
5	10,0
6	10,5
7	10,0
8	9,9
9	10,6
10	10,7
11	10,3
12	10,2
13	10,0
14	10,1
<b>Média</b>	<b>10,2</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,3</b>
<b>Erro relativo (%)</b>	<b>2</b>
<b>Coeficiente de variação (%)</b>	<b>3</b>

O erro relativo (ER) é a diferença entre o valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética de valores) e o valor real, a dividir pelo valor real. O coeficiente de variação (CV) é calculado dividindo o desvio padrão pela média.

O IPAC indica que o erro relativo e o coeficiente de variação dos padrões determinados sejam  $\leq 10\%$  [47]. Pela tabela 3.2., o ER corresponde a 2 % e o CV a 3 %, verificando-se o cumprimento desta recomendação.

### 3.4.5. Precisão

A verificação da precisão do método é determinada pela análise da repetibilidade. Como referido anteriormente, este parâmetro exprime o grau de proximidade dos resultados obtidos para ensaios efetuados sob as mesmas condições de operação, para diferentes gamas de concentração.

Deste modo, o estudo da repetibilidade foi realizado pela determinação, no mínimo, de 10 padrões para as várias gamas de concentração (baixa, média e alta). Posteriormente calculou-se a média, desvio-padrão, erro relativo e coeficiente de variação para os padrões com concentração 10,0, 30,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ .

Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 3.3..

**Tabela 3.3. Concentrações dos padrões de 10,0, 30,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ , média, desvio padrão, erro relativo e coeficiente de variação determinados, respetivamente.**

Ensaio	Concentração do padrão 10,0 ( $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ )	Concentração do padrão 30,0 ( $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ )	Concentração do padrão 60,0 ( $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ )
1	9,6	30,4	64,2
2	10,5	29,7	-
3	10,2	29,0	58,5
4	10,0	29,3	58,5
5	10,0	31,4	61,4
6	10,5	29,1	59,9
7	10,0	29,5	60,7
8	9,9	31,4	60,9
9	10,6	31,0	61,9
10	10,7	32,7	62,5
11	10,3	32,6	62,2
12	10,2	29,3	61,3
13	10,0	30,5	60,0
14	10,1	29,7	60,2
<b>Média</b>	<b>10,2</b>	<b>30,4</b>	<b>60,9</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,6</b>
<b>Erro relativo (%)</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Coeficiente de variação (%)</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>

A repetibilidade do método é avaliada pelo estudo do coeficiente de variação de um conjunto de réplicas determinadas consecutivamente para a mesma amostra. Logo o método é considerado preciso se este coeficiente for igual ou inferior 10 % [47].

Pela análise dos coeficientes de variação (tabela 3.3.) das diferentes concentrações em estudo conclui-se que o método se encontra validado em termos de precisão uma vez que os valores obtidos são inferiores a 10 %.

O IPAC aconselha igualmente que o erro relativo seja menor que 10 %. Portanto pela tabela 3.3. observa-se que os erros relativos obtidos para os padrões de concentração de 10,0, 30,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$  são a 2, 1 e 2 %, respetivamente e inferiores a 10 %.

#### **3.4.6. Exatidão**

Não foi possível a determinação da exatidão do método. Como mencionado no subcapítulo 1.3.2.6. este parâmetro pode ser obtido pela realização de ensaios interlaboratoriais.

A execução de ensaios interlaboratoriais não foi possível devido à inexistência deste tipo de ensaios para a determinação de polifosfatos no bacalhau.

#### 4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

Face aos resultados obtidos para os polifosfatos conclui-se que para o bacalhau demolido e fresco todos os valores obtidos estão dentro do limite máximo de fosfatos autorizado (5 g/kg peixe). Todavia, o mesmo não acontece para o bacalhau seco. Este apresenta 3 valores superiores ao limite legal e uma dispersão dos resultados que não obedece ao modelo previsto.

Relativamente à humidade o teor obtido para o bacalhau demolido, seco e fresco foi de  $71,9 \pm 2,5$  %,  $44,1 \pm 5,9$  % e  $82,8 \pm 0,5$  %, respetivamente. O teor de humidade do bacalhau seco foi inferior ao limite legislado pela EU (47 %) no Decreto-Lei n.º 25/2005.

A quantidade de cloreto de sódio parece não influenciar a quantificação do teor de fósforo, uma vez que as concentrações médias obtidas para os 3 padrões (10,0, 30,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ ) não variam significativamente ao longo da gama de concentração estudada (0-70 %).

Para o processo de validação do método procedeu-se à avaliação dos parâmetros específicos de desempenho do método: linearidade, seletividade, sensibilidade, limite de quantificação e precisão. A exatidão do método não foi determinada através interlaboratoriais dado a sua inexistência relativamente à determinação de fósforo para produtos de pesca.

Através das taxas de recuperação podemos concluir que o método é seletivo para o fósforo uma vez que se obtiveram taxas na ordem dos  $99 \pm 3$  %,  $99 \pm 8$  % e  $100 \pm 2$  %, para o bacalhau demolido, seco e fresco, respetivamente. Estes valores estão de acordo com o critério de validação imposto:  $85 \geq$  taxa de recuperação do analito  $\leq 115$  %.

Pela análise dos coeficientes de correlação das curvas de calibração traçadas conclui-se que o critério de linearidade é satisfeito, sendo os coeficientes de correlação obtidos superiores a 0,995. Assim a curva de calibração encontra-se validada para o analito em estudo.

A sensibilidade do método é definida pela análise da carta de controlo dos declives das curvas de calibração, na qual se observou que a dispersão dos valores não satisfaz completamente a distribuição de Gauss. Devido a esta divergência será necessário a realização de ensaios suplementares de modo a verificar a continuidade desta tendência. No entanto, isto não significa que o método não é capaz de identificar, com determinada segurança, duas concentrações próximas. O erro relativo e o coeficiente de variação dos padrões equivalentes ao limite de quantificação são iguais a 2 e 3 %, respetivamente. Estes resultados estão em conformidade com a recomendação da IUPAC de que o ER e o CV sejam  $\leq 10$  %.

O CV e o ER obtidos para os 3 padrões de concentração 10,0, 30,0 e 60,0  $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ , foram na sua totalidade inferiores a 10 %, logo o método encontra-se validado em termos de precisão.

A análise global dos resultados permite concluir que o método para determinação de fosfatos no bacalhau (norma NP 4495) se encontra validado, uma vez que satisfaz na sua maioria as especificações determinadas para cada parâmetro de validação estudado.

Futuramente seria necessário a realização de um número mais alargado de determinações de fósforo para o bacalhau seco. Estes ensaios são essenciais devido à dificuldade em se obter resultados consistentes quer para a quantificação dos fosfatos, quer para a determinação do teor de humidade, neste tipo de amostras.

É igualmente aconselhável a avaliação da exatidão do método através de ensaios com materiais de referência certificados e/ou de ensaios interlaboratoriais.

## Bibliografia

- [1] Dias, J, Filipe, J, Guia, F, Menezes, R e Guerreiro, V. 2001. A salga do “fiel amigo”: as indústrias portuguesas do bacalhau. (versão PDF do documento descarregada em 17 de Janeiro de 2013).
- [2] Gonçalves, SM, 2011. *Bacalhau Salgado Seco: Influência da Demolha e do Tratamento Culinário na sua Qualidade*. Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. 145pp.
- [3] Adaptado de <http://www.confrariabacalhauilhavo.org/index.php>. (acedido em 14 de Fevereiro de 2013).
- [4] Turismo Centro de Portugal. 2011. Iguarias do Centro - Bacalhau. Aveiro. (versão PDF do documento descarregada em 27 de Fevereiro de 2013).
- [5] Ministério da Agricultura, Pescas e Florestas. 2005. Decreto-Lei n.º 25/2005 de 28 de Janeiro de 2005. Diário da República, I Série-A, N.º 20. (versão PDF do documento descarregada em 28 de Fevereiro de 2013).
- [6] Cohen, DM, Inada, T, Iwamoto, T e Scialabba, N, 1990. *FAO species catalogue - Gadiform fishes of the world*. FAO Fisheries Synopsis, Rome, 442pp.
- [7] Adaptado de <http://star-gazypie.blogspot.pt/2011/09/boston.html> (acedido em 14 de Fevereiro de 2013).
- [8] AIB. 2011. Caderno de especificações do bacalhau de cura tradicional portuguesa. Gafanha da Nazaré, Aveiro. (versão PDF do documento descarregada em 15 de Janeiro de 2013).
- [9] ESAC. 2007. Processamento de bacalhau salgado seco. Instituto Politécnico de Coimbra - Escola Superior Agrária. (versão PDF do documento descarregada em 30 de Janeiro de 2013).
- [10] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. 1988. Aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos aditivos que podem ser utilizados nos géneros destinados à alimentação humana. Diretiva 89/107/CEE do Conselho de 21 de Dezembro de 1988. Jornal Oficial da União Europeia (versão PDF do documento descarregada em 1 de Março de 2013).
- [11] ESB. 2001. Aditivos alimentares. (versão PDF do documento descarregada em 30 de Janeiro de 2013).

- [12] Bjørkevoll, I, Barnung, T, Kvangarsnes, K, Tobiassen, T, Akse, L e Reboredo, RG. 2012. Phosphate treatment of light and heavy salted cod products. ISSN number 0804-54380. (versão PDF do documento descarregada em 15 de Janeiro de 2013).
- [13] SCHRÖDER, U, 2010. Changes in Phosphate and Water Content During Processing of Salted Pacific Cod. *Taylor & Francis*, 19: 16-25.
- [14] Þórarinsdóttir, K A, Arason, S e Þorkelsson, G. 2010. The role and fate of added phosphates in salted cod products. ISSN number 1670-7192. (versão PDF do documento descarregada em 5 de Fevereiro de 2013).
- [15] Adaptado de <http://www.patraoneves.eu/docs/201211101286.pdf> acedido em 25 de Fevereiro de 2013).
- [16] Seafish - The authority of seafood. 2012. Review of polyphosphates as additives and testing methods for them in scallops and prawns. ISBN number 978-1-906634-60-5. (versão PDF do documento descarregada em 5 de Fevereiro de 2013).
- [17] Averbuch-Pouchot, M e Durif, A, 1996. *Topics in Phosphate chemistry*. World Scientific Publishing Co Ltd, 420pp.
- [18] Naidu, A, 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press LLC, 800pp.
- [19] Kulaev, IS, Vagabov, VM e Kulakovskaya, TV, 2004. *The biochemistry of inorganic polyphosphates*. John Wiley & Sons, Ltd, England, 293pp.
- [20] Omelon, S e Grynepas, M. 2008. Relationships between Polyphosphate Chemistry, Biochemistry and Apatite Biomineralization. American Chemical Society. (versão PDF do documento descarregada em 20 de Fevereiro de 2013).
- [21] Jastrzebska, A, Hol, A e Szlyk, E, 2007. Simultaneous and rapid determination of added phosphorus(V) compounds in meat samples by capillary isotachopheresis. *LWT - Food Science and Technology*, 41: 2097-2103.
- [22] Weiner, M, Salminenb, W, Larsonc, P e Barterd, R, 2001. Toxicological review of inorganic phosphates. *Food and Chemical Toxicology*, 39: 759-786.
- [23] Gonçalves, A e Ribeiro, J, 2008. Do phosphates improve the seafood quality? Reality and legislation. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3 (3): 237-247.
- [24] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. 2008. Procedimento de autorização comum aplicável a aditivos alimentares, enzimas alimentares e aromas

alimentares. Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008. Jornal Oficial da União Europeia (versão PDF do documento descarregada em 20 de Fevereiro de 2013).

[25] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. 1995. Aditivos alimentares com excepção dos corantes e dos edulcorantes. Diretiva 95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Fevereiro de 1995. Jornal Oficial da União Europeia (versão PDF do documento descarregada em 20 de Fevereiro de 2013).

[26] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. 2010. Programa de reavaliação de aditivos alimentares aprovados em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. Regulamento (UE) n.º 257/2010 da Comissão de 25 de março de 2010. Jornal Oficial da União Europeia (versão PDF do documento descarregada em 2 de Março de 2013).

[27] Mahadevaiah, B e Nagendrappa, G, 2010. A simple spectrophotometric method for the determination of phosphate in soil, detergents, water, bone and food samples through the formation of phosphomolybdate complex followed by its reduction with thiourea. *Spectrochimica Acta Part A*, 78: 497-502.

[28] Haberer, J e Brandes, J, 2003. A high sensitivity, low volume HPLC method to determine soluble reactive phosphate in freshwater and saltwater. *Marine Chemistry*, 82: 185-196.

[29] Nguyen, MV, Jonsson, JO, Thorkelsson, G e Arason, S, 2011. Quantitative and qualitative changes in added phosphates in cod (*Gadus morhua*) during salting, storage and rehydration. *Food Science and Technology*, 47 (2012): 126-132.

[30] Iammarino, M e Di Taranto, A, 2012. Determination of polyphosphates in products of animal origin: application of a validated ion chromatography method for commercial samples analyses. *Eur Food Res Technol*, 235: 409-417.

[31] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. 2004. Controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. Jornal Oficial da União Europeia (versão PDF do documento descarregada em 17 de Março de 2013).

[32] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. 2002. Execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à

interpretação de resultados requeridos (LMDR) para determinados resíduos em alimentos de origem animal. Decisão (CE) n.º 657/2002 da Comissão de 12 de Agosto de 2002. Jornal Oficial da União Europeia (versão PDF do documento descarregada em 17 de Março de 2013).

[33] Sekiguchi, Y, Matsunagab, A, Yamamoto, A e Inoue, Y, 2000. Analysis of condensed phosphates in food products by ion chromatography with an on-line hydroxide eluent generator. *Journal of Chromatography A*, 881: 639-644.

[34] Denney, R e Sinclair, R, 1993. *Visible and Ultraviolet Spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd, England, 197pp.

[35] Mendham, J, Denney, R, Barnes, J e Thomas, M, 2002. *Vogel - Análise Química Quantitativa*. LTC, 488pp.

[36] Jastrzębska, A, 2009. Modifications of spectrophotometric methods for total phosphorus determination in meat samples. *Chemical Papers*, 63 (1): 47-54.

[37] Berchmansa, S, Issa, T e Singhb, P, 2012. Determination of inorganic phosphate by electroanalytical methods: A review. *Analytica Chimica Acta*, 729: 7-20.

[38] Feinberga, M e Raguenes, N, 1998. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. *Analytica Chimica Acta*, 391: 239-252.

[39] Comité Europeu de Normalização. 2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. EN ISO/IEC 17025:2005. Instituto Português da Qualidade. (versão PDF do documento descarregada em 3 de Março de 2013).

[40] Almeida, M, 2012. *Validação de um Método Analítico: Determinação de fósforo total*. Tese de mestrado em Química. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

[41] Figueiredo, T, 2012. *Validação de métodos analíticos: Determinação do Teor de Açúcar numa amostra de produto alimentar*. Tese de mestrado em Química. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

[42] RELACRE. 2000. Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Guia RELACRE 13. Lisboa. 972-8574-02-9. (versão PDF do documento descarregada em 25 de Julho de 2013).

[43] Valentini, S, Sommer, A e Matioli, G, 2007. Validação de métodos analíticos. *Arq Mudi*, 11(2):26-31.

- [44] Brito, N, Polese, L e Ribeiro, M. 2003. validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Curitiba. (versão PDF do documento descarregada em 5 de Julho de 2013).
- [45] RELACRE. 1998. Alguns exemplos de cartas de controlo em laboratórios de análise química. Guia RELACRE 9. Lisboa. (versão PDF do documento descarregada em 25 de Julho de 2013).
- [46] RELACRE. 1996. Validação de resultados em laboratórios químicos. Guia RELACRE 3. Lisboa. 972-96727-2-5. (versão PDF do documento descarregada em 25 de Julho de 2013).
- [47] IPAC. 2011. Guia para a acreditação de laboratórios químicos. OGC002. Caparica. (versão PDF do documento descarregada em 15 de Julho de 2013).
- [48] Instituto Português da Qualidade. 2002. Carne e produtos cárneos: determinação de cinza total pelo método de referência. NP 1613. (versão PDF do documento descarregada em 31 de Maio de 2013).
- [49] Instituto Português da Qualidade. 2009. Produtos de pesca e de aquicultura: determinação do teor de cinza total pelo método de referência. NP 2032. (versão PDF do documento descarregada em 31 de Maio de 2013).
- [50] Instituto Português da Qualidade. 2008. Carne e produtos cárneos: determinação do teor total de fósforo pelo método espectrofotométrico. NP 1842. (versão PDF do documento descarregada em 31 de Maio de 2013).
- [51] Instituto Português da Qualidade. 2010. Produtos de pesca e de aquicultura: determinação do teor total de fósforo pelo método espectrofotométrico. NP 4495. (versão PDF do documento descarregada em 31 de Maio de 2013).
- [52] Instituto Português da Qualidade. 2002. Carne e produtos cárneos: determinação do teor de humidade pelo método de referência. NP 1614. (versão PDF do documento descarregada em 31 de Maio de 2013).
- [53] Huss, H, 1995. *Quality and quality changes on fresh fish*. FAO, Rome, 203pp.
- [54] Thorarinsdottir, K, Arason, S, Bogason, S e Kristbergsson, K, 2001. Effects of Phosphate on Yield, Quality and Water-Holding Capacity in the Processing of Salted Cod (*Gadus morhua*). *Journal of food science*, 66: 821-826.



## **Anexo A - Curvas de calibração do fósforo**



Na tabela A.1. estão apresentados os parâmetros das 10 curvas de calibração obtidas para a quantificação do fósforo.

**Tabela A.1. Parâmetros das curvas de calibração do fósforo.**

Curva nº	Concentração ( $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ )	Absorvância	Abs = m × Conc + b	R <sup>2</sup>
1	10 - 60	0,014 - 1,091	Abs = 0,01803 × Conc + 0,01117	0,99972
2		0,014 - 1,079	Abs = 0,01798 × Conc + 0,01672	0,99939
3		0,0139 - 1,006	Abs = 0,01697 × Conc + 0,02849	0,99616
4		0,0092 - 1,082	Abs = 0,01791 × Conc + 0,00950	0,99995
5		0,0156 - 1,099	Abs = 0,01814 × Conc + 0,00998	0,99979
6		0,0127 - 1,122	Abs = 0,01841 × Conc + 0,00385	0,99958
7		0,0133 - 1,136	Abs = 0,01862 × Conc + 0,00984	0,99976
8		0,0134 - 1,151	Abs = 0,01922 × Conc + 0,00051	0,99859
9		0,0153 - 1,134	Abs = 0,01873 × Conc + 0,01127	0,99982
10		0,0127 - 1,122	Abs = 0,01851 × Conc + 0,01585	0,99991



## **Anexo B – Critérios de aceitação do branco e padrões de controlo e de validação**



Nas tabelas seguintes (B.1. a B.4.) estão exibidos os critérios de aceitação para o branco e para os padrões de controlo e de validação [47].

- **Concentração branco**  $\leq \frac{\text{Concentração P}_{10}}{3}$

**Tabela B.1. Verificação do critério de aceitação do branco.**

Ensaio nº	Concentração Branco ( $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ )	Concentração P <sub>10</sub> <sub>3</sub> ( $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{mL}$ )	Validação
1	0,89	3,2	✓
2	0,29	3,5	✓
3	0,33	3,4	✓
4	0,41	3,3	✓
5	0,25	3,3	✓
6	0,64	3,5	✓
7	0,13	3,3	✓
8	0,14	3,3	✓
9	0,21	3,5	✓
10	0,14	3,6	✓
11	0,18	3,4	✓
12	0,27	3,4	✓
13	0,032	3,3	✓
14	0,043	3,4	✓

- Critério aceitação 20 %:  $8,0 \leq \text{Concentração } P_{10} \leq 12,0 \mu\text{g } P_2O_5/\text{mL}$

Tabela B.2. Verificação do critério de aceitação do padrão de validação de concentração  $10,0 \mu\text{g } P_2O_5/\text{mL}$ .

Ensaio nº	Concentração padrão 10,0 ( $\mu\text{g } P_2O_5/\text{mL}$ )	Validação
1	9,6	✓
2	10,5	✓
3	10,2	✓
4	10,0	✓
5	10,0	✓
6	10,5	✓
7	10,0	✓
8	9,9	✓
9	10,6	✓
10	10,7	✓
11	10,3	✓
12	10,2	✓
13	10,0	✓
14	10,1	✓

- Critério aceitação 10 %:  $27,0 \leq \text{Concentração } P_{30} \leq 33,0 \mu\text{g } P_2O_5/\text{mL}$

Tabela B.3. Verificação do critério de aceitação do padrão de controlo de concentração  $30,0 \mu\text{g } P_2O_5/\text{mL}$ .

Ensaio nº	Concentração padrão 30,0 ( $\mu\text{g } P_2O_5/\text{mL}$ )	Validação
1	30,4	✓
2	29,7	✓
3	29,0	✓
4	29,3	✓
5	31,4	✓
6	29,1	✓
7	29,5	✓
8	31,4	✓
9	31,0	✓
10	32,7	✓
11	32,6	✓
12	29,3	✓
13	30,5	✓
14	29,7	✓

- Critério aceitação 10 %:  $54,0 \leq \text{Concentração } P_{60} \leq 66,0 \mu\text{g } P_2O_5/\text{mL}$

Tabela B.4. Verificação do critério de aceitação do padrão de validação de concentração  $60,0 \mu\text{g } P_2O_5/\text{mL}$ .

Ensaio nº	Concentração padrão 60,0 ( $\mu\text{g } P_2O_5/\text{mL}$ )	Validação
1	64,2	✓
2	50,5	×
3	58,5	✓
4	58,5	✓
5	61,4	✓
6	59,9	✓
7	60,7	✓
8	60,9	✓
9	61,9	✓
10	62,5	✓
11	62,2	✓
12	61,3	✓
13	60,0	✓
14	60,2	✓