



# **Análise semi-quantitativa e quantitativa de bebidas não alcoólicas com uma língua electrónica**

**Tânia Patrícia Gonçalves Barcelos**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

**Doutor Luís Avelino Guimarães Dias**

**Doutor António Manuel Coelho Lino Peres**

**Bragança**

**2009**

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito dos projectos de investigação POCI/QUI/58706/2004 e PPCDT/QUI/58076/2004, financiados pela FCT.

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

## Resumo

Neste trabalho usou-se uma língua electrónica constituída por dois sistemas de multi-sensores, com 40 membranas poliméricas sensibilidade cruzada, com composições diferentes, e um eléctrodo de referência Ag/AgCl. O sistema foi aplicado na análise semi-quantitativa de bebidas não alcoólicas e na quantificação das concentrações de compostos orgânicos e açúcares existentes nessas bebidas. As concentrações de açúcares (frutose e glucose), do antioxidante (ácido ascórbico) e dos acidificantes (ácido málico e ácido cítrico) foram determinadas por HPLC.

Os sinais das membranas poliméricas registados durante a análise das bebidas não alcoólicas com a língua electrónica foram tratados recorrendo a métodos quimiométricos não supervisionados (análise dos componentes principais) e métodos supervisionados (análise discriminante linear, regressão linear múltipla e regressão pelos mínimos quadrados parciais).

Na análise semi-quantitativa, o objectivo foi diferenciar quatro grupos de bebidas não alcoólicas com diferentes concentrações de sumo de fruta adicionado: superiores a 30%, entre 14% e 30%, 5% e 10% e 0.1% e 2%. Foram analisadas, com a língua electrónica, 16 bebidas portuguesas adquiridas em supermercados. Os dados obtidos foram tratados com análise discriminante linear com o procedimento “stepwise”, o que permitiu classificar correctamente 100% dos dados originais e 93.8% no processo de validação cruzada.

Para quantificar as concentrações dos acidificantes e açúcares foram usados dois métodos lineares para a obtenção de modelos de estimação/previsão: regressão linear múltipla e método dos mínimos quadrados parciais. Os modelos lineares obtidos apresentaram bons coeficientes de determinação ( $R^2 > 0,84$ ), tanto no grupo de calibração como no grupo de validação cruzada, para a estimação e previsão das concentrações dos açúcares. O modelo de previsão obtido para a quantificação do ácido cítrico não apresentou resultados satisfatórios. Para o ácido málico verificou-se não haver informação suficiente nos sinais obtidos da língua electrónica para obter qualquer modelo de quantificação. O ácido ascórbico não foi considerado no estudo quantitativo porque não foi encontrado em todas as amostras.

## Abstract

In this work was used an electronic tongue built with two multi-sensors system, with 40 different polymeric membranes with cross-sensibility, and an Ag/AgCl reference electrode. These devices were applied in semi-quantitative analysis of soft drinks and in the quantification of organic acids and sugars present in these beverages. The beverage's composition in sugars (fructose and glucose) and organic acids (ascorbic acid, malic acid and citric acid) was determined by HPLC.

The signals of the electronic tongue polymeric membranes obtained in the analysis were treated with non-supervised multivariate methods such as, principal components analysis, and supervised methods such as, linear discriminant analysis, multiple linear regression and partial least square regression.

In semi-quantitative analysis, the objective was to differentiate four non-alcoholic beverages with different added fruit juice contents: higher than 30%, between 14%-30%, 5%-10% and 0.1%-2%. A set of 16 portuguese beverages, purchased in supermarkets, were analysed with the electronic tongue device. The data obtained were treated by stepwise linear discriminant analysis, allowing a 100% overall correct classification using the original data and 93.8% for the cross-validation procedure.

For the quantification of the organic acids and sugars were used two linear methods to obtain estimation/prediction models: multiple linear regression and partial least squares regression. All linear models obtained for the estimation and prediction of concentrations of sugars in the beverages, showed a good coefficient of determination ( $R^2 > 0,84$ ) for the original data and for the cross-validation procedure, respectively. The predictive model obtained for the citric acid quantification did not produced satisfactory results. For malic acid there was no sufficient information in the signals from the electronic tongue to obtain a quantification linear model. Ascorbic acid was not considered in the quantitative study because it was not found in all samples.

## Agradecimentos

Pelo amor dos meus pais, que muito se sacrificaram para que eu pudesse atingir os meus objectivos.

Ao Doutor Luís Dias, meu orientador, por todo o empenhamento, disponibilidade, apoio e compreensão a todos os níveis e também pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Doutor António Peres, meu co-orientador, pelo apoio prestado.

Ao Eng. Sá Morais pela disponibilidade e ajuda nas análises cromatográficas e por todos os conhecimentos transmitidos.

Às minhas amigas (Joana, Catarina, Tânia, Sandra, Filipa e Zulmira) e aos colegas de licenciatura pelos momentos de descontração. Um especial agradecimento à Filipa Reis pelo auxílio prestado na parte experimental deste trabalho.

Ao meu namorado pela sua paciência e por todo o seu amor.

Aos amigos que deixei na Madeira, pelo carinho que sempre demonstraram por mim, mesmo estando longe.

Colegas de trabalho do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, pelo apoio e bom ambiente de trabalho.

Pelo apoio da minha família em especial as minhas “títias”, a minha Avó e aos meus maninhos.

A todos que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

# Índice geral

Índice de Tabelas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Abreviaturas.....	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Objectivos.....	2
1.2. Estrutura da dissertação.....	2
2. Aspectos gerais.....	4
2.1. Língua electrónica.....	4
2.1.1. Princípios electroquímicos e aplicações.....	4
2.1.2. Sensores.....	5
2.2. Métodos quimiométricos.....	7
2.3. Bebidas não alcoólicas.....	9
3. Material e Métodos.....	12
3.1. Reagentes.....	12
3.2. Amostras.....	12
3.3. Soluções padrão para o HPLC.....	13
3.4. Análises com HPLC.....	14
3.5. Preparação das membranas poliméricas.....	14
3.6. Análise por multi-sensores.....	15
3.7. Análise estatística.....	17
3.7.1. Análise exploratória multivariada com ACP.....	17
3.7.2. Classificação com ADL.....	17
3.7.3. Quantificação com RLM.....	19
3.7.4. Quantificação com MQP.....	20
4. Resultados.....	22
4.1. Análise por HPLC.....	22
4.1.1. Cromatogramas do HPLC.....	22
4.1.2. Calibração do HPLC.....	24
4.1.3. Análise de componentes principais.....	25
4.2. Análise com a língua electrónica.....	27
4.2.1. Avaliação semi-quantitativa das bebidas não alcoólicas.....	28
4.2.2. Análise quantitativa das bebidas não alcoólicas.....	31
5. Conclusão.....	37
Bibliografia.....	39
ANEXO 1.....	42

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Descrição das bebidas analisadas. ....	13
Tabela 2 – Aditivos e plastificantes usados na preparação das membranas poliméricas. ....	15
Tabela 3 – Concentrações das soluções padrão e parâmetros obtidos da calibração. ....	24
Tabela 4 – Intervalo de concentrações dos açúcares, dos acidificantes e do antioxidante presentes nas bebidas, analisadas por HPLC. ....	25
Tabela 5 – Matriz de contingência da classificação dos 4 grupos de bebidas pelo procedimento de validação cruzada ....	30
Tabela 6 – Estatísticas dos modelos RLM e MQP seleccionados para a calibração ( $EPE_C$ e $R^2$ ) e validação cruzada ( $EPP_{VC}$ e $R^2$ ). ....	33
Tabela 7 – Procedimento de validação dos modelos RLM e MQP por comparação entre os valores previstos e os esperados. ....	35

## Índice de Figuras

Figura 1 – Língua electrónica: sistema de multi-sensores com o eléctrodo de referência Ag/AgCl.....	16
Figura 2 – Montagem experimental para a análise com a língua electrónica....	16
Figura 3 – Exemplos de cromatogramas de HPLC, obtidos com o detector UV, de cada um dos grupos de bebidas analisadas. ....	23
Figura 4 – Exemplo típico de um cromatograma de HPLC obtido para a amostra Sumo de Manga “Marca1” com o detector índice de refacção.. ....	24
Figura 5 – Gráfico bidimensional da ACP das concentrações do antioxidante, dos acidificantes e dos açúcares presentes nas amostras analisadas por HPLC.. ....	26
Figura 6 – Perfil dos sinais obtidos nas análises com a língua electrónica .....	27
Figura 7 – ADL dos 4 grupos de bebidas com os sinais de todas as membranas poliméricas .....	29
Figura 8 – ADL “stepwise” dos 4 grupos de bebidas não alcoólicas.....	30
Figura 9 – Concentrações estimadas e previstas do ácido cítrico, frutose e glucose pelos modelos MQP e RLM versus dados experimentais obtidos por HPLC.....	34

## Abreviaturas

- ACP – Análise dos componentes principais
- ADL – Análise discriminante linear
- HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho (abreviatura do inglês “High Performance Liquid Chromatography”)
- PVC – Cloreto de polivinilo (abreviatura do inglês “Polyvinyl Chloride”)
- CP – Componentes principais
- UV – Ultravioleta
- UV/Vis – Ultravioleta e visível
- VIF – Factor de inflação da variância (abreviatura do inglês “Variance Inflation Factor”)
- RLM – Regressão linear múltipla
- RL – Regressão linear
- MQP – Mínimos quadrados parciais
- $R^2$  – Coeficiente de determinação da calibração
- $R^2_{VC}$  – Coeficiente de determinação da validação cruzada
- $EPE_C$  – Erro padrão de estimação da calibração
- $EPP_{VC}$  – Erro padrão de previsão da validação cruzada

# 1. Introdução

As bebidas não alcoólicas são produzidas em quase todos os países do mundo, havendo uma grande variedade em sabores, marcas e embalagens [1]. Os consumidores mostram grande exigência no produto final, ao nível da qualidade, aroma e sabor. A indústria procura manter o seu produto dentro de intervalos de qualidade bastante apertados, para controlar o sabor do produto, com o objectivo de manter o consumo regular do produto. Estes critérios, numa produção industrial de bebidas, exigem um laboratório com recurso a equipamentos sofisticados para certificar que os parâmetros apresentados nos rótulos do produto final estão correctos antes de finalizar o empacotamento, bem como para monitorizar todas as etapas de produção. Na comercialização, o controlo de qualidade passa também por garantir ao consumidor que os produtos não são adulterados e que se encontram em bom estado de consumo. Em geral, nas análises químicas e físicas usam-se métodos instrumentais que exigem técnicos especializados quer na preparação das amostras quer na utilização dos equipamentos [2,3]. Em relação às análises sensoriais, as técnicas instrumentais não são as mais indicadas porque a relação entre a composição química e o sabor não está estabelecida [3]. Este tipo de análise é efectuado por painéis de provadores treinados (o que exige recursos, tempo e dinheiro) para avaliar o sabor e aroma dos alimentos com uma reprodutibilidade aceitável. A principal desvantagem dos testes sensoriais deve-se ao número limitado de provas por dia que cada provador pode fazer [3,4].

Com o objectivo de arranjar alternativas, nos últimos anos tem-se assistido ao desenvolvimento de diferentes tipos de línguas electrónicas [2,3,5-7,9-23] que conjuntamente com técnicas quimiométricas, permitem a análise sensorial e química dos alimentos [5]. Futuramente, a língua electrónica poderá auxiliar o Homem no estudo da qualidade dos géneros alimentícios, visto que esta é mais sensível que a língua biológica [6].

Neste contexto, o presente trabalho teve como objectivo a aplicação de uma língua electrónica, desenvolvida para análise sensorial e química, na análise semi-quantitativa e quantitativa de bebidas não alcoólicas.

## 1.1. Objectivos

Neste estudo pretendeu-se aplicar uma língua electrónica, com membranas lipo/poliméricas, na análise de bebidas não alcoólicas. O sistema aplicado continha membranas poliméricas de baixa selectividade e de sensibilidade cruzada a constituintes presentes na matriz líquida da amostra. Como objectivo global pretendeu-se averiguar se a informação analítica obtida pelos sensores permitia efectuar análise qualitativa e quantitativa de bebidas não alcoólicas.

Como objectivos específicos pretendeu-se:

- Verificar se a língua electrónica potenciométrica permitia a distinção de bebidas não alcoólicas com diferentes níveis de sumo de fruta;
- Verificar as potencialidades da língua electrónica potenciométrica para quantificação de açúcares (glucose e fructose) e de acidificantes (ácido cítrico e ácido málico) presentes em todas as amostras de bebidas;

Como objectivo auxiliar aplicou-se um método de cromatografia líquida (HPLC), método de referência, para detectar e quantificar as concentrações de glucose, frutose, ácido cítrico, ácido málico e ácido ascórbico nas amostras de bebidas.

## 1.2. Estrutura da dissertação

Este relatório está organizado em quatro capítulos onde se descreve o trabalho de investigação realizado.

O contexto e âmbito da tese são introduzidos no presente capítulo. Faz-se uma introdução sobre os tipos de língua electrónica e sensores actualmente sob investigação, bem como, uma revisão bibliográfica sobre as suas aplicações. Apresentam-se os métodos quimiométricos usados no tratamento dos dados experimentais, faz-se uma breve introdução das amostras usadas neste trabalho e, por fim, apresentam-se os objectivos do trabalho.

No Capítulo 2 apresentam-se os materiais, reagentes, equipamentos, preparação de soluções, procedimentos analíticos e a língua electrónica

desenvolvida, bem como, o tratamento estatístico multivariado dos dados experimentais. No Capítulo 3 mostra-se o tratamento dos dados experimentais obtidos por HPLC e pela língua electrónica, e a discussão dos resultados subsequentes. No Capítulo 4 apresentam-se as conclusões mais relevantes do capítulo anterior, efectuando-se também uma apreciação global.

## **2. Aspectos gerais**

### **2.1. Língua electrónica**

A língua electrónica é um instrumento concebido para identificar e medir sabores, imitando as línguas biológicas. Nestas últimas, as substâncias responsáveis pelo sabor são recebidas pelas células sensoriais das papilas gustativas, que transformam a informação num sinal eléctrico, permitindo ao cérebro identificar os padrões básicos do paladar, que são o amargo, o ácido, o salgado, o doce e o umami (palavra japonesa para delicioso) [6].

A língua electrónica, um sistema de multisensores, funciona de maneira similar. Quando é imersa num líquido obtém-se um padrão de sinais eléctricos que variam em função do líquido analisado, sendo posteriormente decomposto em informação qualitativa e ou quantitativa. Esta capacidade de agrupar a informação recebida é denominada de selectividade global [6,7].

As línguas electrónicas que se encontram descritas na bibliografia [2,3,5-7,9-23] baseiam-se em diferentes princípios electroquímicos usados na medição do sinal dos sensores, também são definidos diferentes tipos de sensores que podem aplicados.

#### **2.1.1. Princípios electroquímicos e aplicações**

Na literatura estão descritas línguas electrónicas que funcionam de acordo com diferentes princípios electroquímicos, sendo os mais referidos, o potenciométrico e o voltamétrico. A potenciometria envolve a medição do potencial de uma célula a intensidade de corrente zero, que é proporcional ao logaritmo da concentração da substância a determinar. Na voltametria, um potencial crescente (ou decrescente) é aplicado na célula até que ocorra a oxidação (ou redução) da substância a analisar, correspondendo a uma subida (ou descida) de sinal da corrente, sendo o tamanho do pico de corrente directamente proporcional à concentração do material electroactivo [8].

Na área alimentar, as línguas electrónicas potenciométricas têm sido usadas para discriminar bebidas [6,9-13] e alimentos [2], detectar diferentes álcoois em bebidas alcoólicas [14] e contaminantes em água [11], identificar adulterações no leite [15], classificar vinho [3] e mel [16], reconhecer e classificar plantas [17] e quantificar sabores e alguns compostos [6,11]. As línguas electrónicas, com base no princípio voltamétrico, foram também capazes de discriminar o sabor amargo de diferentes substâncias em soluções aquosas [18], identificar adulterações no vinho [19], monitorizar processos de lavagem no processamento do leite e distinguir as diferentes origens do leite [20].

Para as línguas electrónicas estão descritos na bibliografia diferentes tipos de sensores, nomeadamente de: membranas lipo/poliméricas [5,6,14-17], membranas de vidro-calcogênio [9,11], membranas poliméricas selectivas a aniões em conjunto com membranas poliméricas selectivas a aniões ou catiões (membranas genéricas) [7,9,17] e fios metálicos [21].

### **2.1.2. Sensores**

Os sensores utilizados nas línguas electrónicas não são, em geral, selectivos, contrariamente aos sensores químicos tradicionais, que detectam substâncias químicas com elevada selectividade [7]. O estudo do paladar não se deve basear em substâncias específicas mas, no conjunto destas como um todo, para se poder determinar a intensidade e a qualidade do sabor. Por esta razão, as características principais de uma língua electrónica são a sensibilidade e a estabilidade, sendo a selectividade um parâmetro menos importante [6]. Estas características são conseguidas usando sensores químicos não específicos ou de baixa selectividade e de sensibilidade cruzada para diferentes espécies existentes na matriz de qualquer solução líquida [7].

Nestes instrumentos usam-se sensores de membranas lipo/poliméricas [5,6,14-17] ou de vidro-calcogênio [9,11] e os trabalhos realizados com línguas electrónicas com estes dois tipos de membranas são, em geral, de natureza qualitativa. Noutros trabalhos são mencionadas línguas electrónicas constituídas por membranas poliméricas com selectividade genérica e

selectivas a iões [7,9,17]. Esta nova combinação permite a obtenção de informação quer geral quer selectiva sobre a amostra, permitindo em alguns trabalhos efectuar também análise quantitativa, além da qualitativa. Na literatura é possível encontrar alguns exemplos da aplicação destes sistemas híbridos em trabalhos de análise qualitativa [7,9,17].

A utilização das línguas electrónicas para análise quantitativa encontra-se descrita num reduzido número de trabalhos. Alguns dos trabalhos encontrados são: medição quantitativa de substâncias orgânicas no vinho, tais como etanol e ácidos orgânicos, com uma língua electrónica baseada em membranas de vidro-calcogênio [11]; simulação do envelhecimento de sumos usando um sistema de multi-sensores com membranas de vidro-calcogênio e membranas convencionais de eléctrodos selectivos a iões [9]; determinação da percentagem de sumo de laranja em sumos através de um sistema de multi-sensores formados por membranas genéricas e selectivas [22]; quantificação de compostos na urina com uma língua electrónica contendo eléctrodos metálicos, sensores genéricos e selectivos a iões baseados em membranas de PVC [21]; quantificação dos compostos principais de um tipo de chá com uma língua electrónica baseada em membranas genéricas e selectivas a iões, membranas de filmes de polianilina e polipirrole preparadas por deposição electroquímica e biosensores de glucose [23].

Neste trabalho construiu-se uma língua electrónica potenciométrica de membranas lipo/poliméricas, tendo como referência um trabalho anterior sobre sensores de sabor [6]. As membranas poliméricas foram preparadas com base na matriz de cloreto de polivinílico (PVC), devido à simplicidade da preparação da membrana constituída por inclusão no PVC, uma substância plastificante, que permite que a membrana tenha propriedades de fase líquida, e uma substância aditiva (elemento activo de reconhecimento), que interage com diferentes compostos na membrana, provenientes da matriz líquida em análise [8,24]. A sensibilidade de um sensor a um conjunto de substâncias depende não só da natureza do componente activo mas, também, da composição final da membrana, incluindo a natureza e quantidade de plastificante [8].

O tratamento dos perfis de sinais registados pelas línguas electrónicas é feito recorrendo a métodos quimiométricos. Estes últimos são métodos

estatísticos multivariados que permitem interpretar a informação fornecida pelas línguas electrónicas.

## 2.2. Métodos quimiométricos

A Quimiometria é uma área científica onde se estuda a aplicação de métodos estatísticos multivariados a dados de origem química.

O aparecimento de novas técnicas instrumentais de análise química, como as línguas electrónicas, associado ao crescente desenvolvimento computacional acoplado a estas, tem conduzido a um aumento da complexidade dos dados experimentais obtidos. Por exemplo, a interpretação de dados oriundos de sistemas multicomponentes é uma das áreas de maior interesse em Quimiometria, recorrendo-se a métodos estatísticos multivariados. Estes métodos permitem a redução do número de variáveis independentes inicialmente avaliadas num dado estudo e proceder a análises qualitativas (classificação e discriminação) e quantitativas (obtenção de modelos de calibração e previsão) [25].

Neste trabalho, utilizaram-se dois tipos de métodos quimiométricos: métodos multivariados não supervisionados (como a análise dos componentes principais, ACP) e métodos multivariados supervisionados (como a análise discriminante linear, ADL; a regressão linear múltipla, RLM; e, o método dos mínimos quadrados parciais, MQP). Nestes dois grupos, são estudadas as relações entre as variáveis e estas são agrupadas consoante as suas semelhanças. O que os distingue é o facto de nos métodos de análise multivariados supervisionados os grupos serem pré-estabelecidos, enquanto nos métodos multivariados não supervisionados isso não acontece [25,26].

**Análise dos componentes principais.** A ACP é uma técnica de análise exploratória multivariada que permite transformar um conjunto de variáveis quantitativas iniciais correlacionadas entre si noutro conjunto com um menor número de variáveis independentes (não correlacionadas). Ou seja, a ACP é

um método de redução da complexidade dos dados que permite resumir a informação de variáveis correlacionadas a uma ou mais combinações lineares ortogonais que detêm a maior parte da informação presente nas variáveis originais [27,28]. O objectivo essencial da ACP é revelar as relações entre variáveis independentes, entre variáveis dependentes e entre variáveis dependentes e independentes. Posteriormente, as componentes principais podem ser utilizadas em técnicas estatísticas onde seja exigido que as variáveis em estudo sejam independentes, como por exemplo, na RLM [27].

**Análise discriminante linear.** A ADL é uma técnica estatística multivariada aplicável quando a variável dependente é qualitativa (grupos) e as variáveis independentes são quantitativas. É um procedimento que permite identificar as variáveis que diferenciam um ou mais grupos de indivíduos estatisticamente diferentes. Posteriormente, as variáveis são utilizadas para obter uma ou mais funções discriminantes que permitem diferenciar os grupos. Com esta informação é possível classificar a que grupo pertence novos casos. A selecção das variáveis é um aspecto muito importante para a obtenção de uma boa classificação. A utilização de toda a informação disponível conduz em muitas situações à introdução de ruído e ao agravamento de problemas, como por exemplo, uma maior sobreposição nos grupos [27].

**Regressão linear múltipla.** A RL é um modelo estatístico usado para determinar o valor de uma variável dependente quantitativa e contínua com base na sua relação linear com uma (regressão linear simples) ou mais variáveis independentes [27,28]. O objectivo desta técnica consiste em descrever, prever e controlar a variável de interesse com base nas variáveis independentes.

Em geral, a utilização de mais do que uma variável independente permite melhorar a capacidade de previsão do modelo de regressão linear simples, visto que, a variável dependente é normalmente afectada por mais do que uma variável [26].

**Mínimos quadrados parciais.** Os MQP são uma técnica estatística recente que generaliza e combina a análise dos componentes principais e a regressão linear múltipla. É particularmente útil quando é necessário estimar e ou prever variáveis dependentes a partir de um grande conjunto de variáveis independentes [26].

O método MQP permite ignorar os pressupostos que é necessário cumprir para aplicar o modelo RLM, de forma a ter confiança nos resultados de previsão, como, por exemplo, a multi-colinearidade [26,29]. O método inclui quer a variável dependente (y), quer as variáveis independentes (X) nas operações de cálculo, com o objectivo de minimizar os erros através do uso de componentes principais (novas variáveis ortogonais) quer para X quer para y.

Trabalhos recentes mostraram que os métodos quimiométricos em conjunto com dados obtidos a partir da análise com as línguas electrónicas são uma ferramenta importante para a análise de bebidas alcoólicas (cerveja, vinho e whiskey) [3,6,9-12,14,15,19] e não alcoólicas (chá, café, sumos, água e leite) [6,9,11,12,13,18,20,23]. Estes trabalhos apresentam maioritariamente, aplicações qualitativas das línguas electrónicas em bebidas.

### **2.3. Bebidas não alcoólicas**

As bebidas não alcoólicas estudadas neste trabalho estão incluídas em 4 grupos diferentes atendendo aos níveis de sumo de fruta adicionados. Foram seleccionadas bebidas que são definidas como “bebidas que contêm sumos de frutas e outros constituintes de valor tecnológico ou nutricional adicionados para melhorar a aparência e estabilidade do produto e assegurar as suas propriedades organolépticas e um tempo de vida razoável” [1].

O objectivo foi verificar se a língua electrónica permitia distinguir os grupos de bebidas que apresentam matrizes diferentes, bem como quantificar açúcares e alguns dos compostos usados para preservar as bebidas, nomeadamente os ácidos orgânicos que são usados como acidificantes e antioxidantes nas bebidas.

Nas bebidas não alcoólicas obtidas a partir de sumo de fruta, os componentes maioritários são a frutose, glucose e sacarose. O sumo de fruta adicionado tem uma grande contribuição para estas elevadas concentrações de açúcares, pois na sua constituição 98% dos sólidos solúveis totais são hidratos de carbono. No entanto, nem todos os açúcares são provenientes do sumo de fruta. No fabrico de bebidas de fruta não alcoólicas é permitida a adição de açúcares em quantidades que não representem mais de 20%, em massa, do produto acabado [30] e que não alterem o seu carácter original [31]. A adição de açúcares às bebidas de fruta é efectuada com o objectivo de corrigir o gosto ácido ou com fins edulcorantes [30].

No grupo dos aditivos, analisou-se por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, abreviatura do inglês “high performance liquid chromatography”) o ácido cítrico e o ácido málico, por estarem referidos em todos os rótulos das bebidas seleccionadas, bem como o ácido ascórbico, referido em parte dos rótulos.

Como já foi referido, os acidificantes e os antioxidantes, tais como, ácidos orgânicos e vitaminas, respectivamente, são frequentemente utilizados no fabrico de bebidas de fruta, com objectivos tecnológicos. Os ácidos orgânicos apresentam um elevado poder acidificante, são emulsionantes e agentes quelantes de iões metálicos. Todas estas características fazem com que os ácidos orgânicos desempenhem diversas funções quando adicionados aos sumos [32]. No entanto, a função mais importante dos ácidos orgânicos é manter um pH correcto para que seja garantida a segurança e a preservação dos alimentos. O ácido cítrico é o ácido orgânico mais utilizado na indústria alimentar, com a finalidade de reforçar a actividade dos antioxidantes, regular a acidez, aromatizar e conservar a cor. O ácido málico também é muito usado, caracterizando-se pelo seu elevado potencial para realçar o sabor. Misturas de ácido cítrico e ácido málico são frequentemente usadas por se considerar que fornecem melhores características de sabor à bebida do que qualquer acidulante adicionado individualmente [1,33].

As vitaminas, mais concretamente a vitamina C ou ácido ascórbico, são utilizadas nas bebidas como antioxidantes. Estes compostos são usados para retardar a alteração dos alimentos causada pela oxidação lipídica, contribuindo

para aumentar a durabilidade dos alimentos, preservar a qualidade do sabor e evitar a descoloração [1,34].

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Reagentes

As substâncias utilizadas na preparação das membranas poliméricas foram todas da marca Fluka. A matriz polimérica utilizada foi o cloreto de polivinilo de elevado peso molecular (PVC) e o solvente o tetrahidrofurano. Em cada membrana polimérica foi adicionado um de seis plastificantes: ftalato de bis(2-etil-hexilo), adipato de bis(1-butil-pentilo), fosfato de tris(2-etil-hexilo), sebacato de dibutilo, 2-nitrofenil-octil-éter e fosfato de dioctil-fenilo. Na preparação das membranas utilizou-se ainda, uma de seis substâncias aditivas: octadecilamina, fosfato de bis(2-etil-hexilo), álcool oleílico, cloreto de metil-trioctil-amónio, cloreto de tridodecil-metil-amónio e ácido oleico.

O eluente para análise cromatográfica foi preparado com o ácido fosfórico adquirido à Panreac, reagente de qualidade analítica.

As soluções padrão dos componentes dos sumos usadas para calibrar o HPLC foram preparadas com os reagentes de qualidade analítica: ácido cítrico mono hidratado (Fisher), L(+)-ácido ascórbico (Panreac), L(-)-ácido málico (Merck), glucose(Fluka) e frutose (Fluka).

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada.

### 3.2. Amostras

Neste trabalho estudou-se as capacidades analíticas de uma língua electrónica em bebidas não alcoólicas com diferentes níveis de adição de sumos de fruta. Quatro grupos de bebidas não alcoólicas foram considerados: (1) mais que 30 % de sumo de fruta adicionado, (2) entre 14-30 %, (3) entre 5-10 % e (4) menos que 4 % (Tabela 1). As bebidas foram adquiridas em superfícies comerciais da cidade de Bragança (Portugal), num total de 16, quatro amostras por grupo. As amostras foram analisadas por HPLC e com a língua electrónica.

Tabela 1 – Descrição das bebidas analisadas.

Grupo	Bebida	Composição em sumo de fruta adicionado á bebida*
1	Sumo de Manga “Marca 1”	>30% de sumo
	Sumo Tutti Frutti “Marca 1”	>50% de sumo
	Sumo de Ananás “Marca 1”	>50% de sumo
	Sumo de Pêssego “Marca 1”	>50% de sumo
2	Sumo de Laranja “Marca 2”	20% de sumo
	Sumo Morango “Marca 2”	>14% de sumo
	Sumo de Ananás “Marca 2”	>20% de sumo
	Sumo de 8 Frutos “Marca 2”	>20% de sumo
3	Sumo de Ananás “Marca 3”	6% de sumo
	Sumo de Laranja “Marca 3”	8% de sumo
	Sumo de Laranja “Marca 4”	10% de sumo e polpa
	Sumo de Ananás “Marca 4”	8% de sumo e polpa
4	Ice Tea de Pêssego “Marca 5”	0,1% de sumo e 4,7% de chá preto
	Ice Tea Vermelho “Marca 5”	3,4% de sumo e 3,3% de extracto de chá
	Ice Tea de Limão “Marca 5”	0,1% de sumo e 4,7% de chá
	Ice Tea de Manga “Marca 5”	0,13% de sumo e 4,7% de chá

\*) Valores fornecidos no rótulo.

### 3.3. Soluções padrão para o HPLC

Na análise química das bebidas, preparou-se uma solução padrão contendo ácido ascórbico (1,019 g/L), ácido málico (2,968 g/L) e ácido cítrico (4,676 g/L). O sistema HPLC foi calibrado usando 6 soluções padrão preparadas a partir desta solução. As soluções padrão, com um volume final de 50,0 mL, foram preparadas por diluição de 10, 5, 3, 2, 1 e 0,5 mL da solução concentrada. Para a determinação do teor de açúcares no sumos foi preparada uma solução padrão concentrada de frutose (15,237 g/L) e glucose (15,109 g/L). A partir desta solução foram preparadas cinco novas soluções padrão por diluição de 20, 10, 5, 2 e 0,5 mL ao volume final de 25,0 mL, com água desionizada.

### 3.4. Análises com HPLC

As análises foram realizadas num sistema cromatográfico constituído por um HPLC Varian, equipado com uma bomba Prostar 220, um injector manual Rheodyne modelo 7725i, provido com um loop de 20  $\mu\text{L}$ , um forno Jones Chromatography modelo 7981 e uma coluna Supercogel C-610H com 30 cm x 7,8 mm ID de dimensão (empacotamento esférico de 9 $\mu\text{m}$  do tipo poliestireno-divinilbenzeno sulfonado). Na análise cromatográfica foram usados dois detectores colocados em série: o detector índice de refração modelo RI-4 da Varian (à temperatura de 45 °C), para a medição dos açúcares (frutose e glucose) e o detector UV/VIS modelo 9050 da Varian (comprimento de onda ajustado a 210 nm) para a detecção e quantificação de ácido ascórbico, ácido málico e ácido cítrico.

Durante as análises, a coluna foi mantida a 30 °C e o detector a 45 °C. Nas análises utilizou-se a eluição isocrática (fluxo de 1,0 mL/min) usando como eluente, a solução aquosa de ácido fosfórico a 0,1 % que foi mantido a 35 °C. Os dados foram recolhidos, registados e tratados num Software Star Chromatography Workstation, versão 4,5.

Todos os eluentes usados e as amostras analisadas no HPLC foram previamente filtradas com um filtro Whatman de porosidade 0,2  $\mu\text{m}$  Nylon. Os eluentes e as amostras com gás foram desgaseificadas durante 10 minutos, antes de serem utilizados, num banho de ultra-sons de marca Elma Transsonic 460/H. Todas as amostras de bebidas foram diluídas 10 vezes (2,5 mL da bebida diluídos num balão volumétrico de 25 mL, com água desionizada).

### 3.5. Preparação das membranas poliméricas

As 36 membranas poliméricas foram preparadas com aproximadamente 31,9-32,3 % de PVC, 64,7-65,2 % de composto plastificante e 2,8-3,2 % de composto aditivo.

Para obter um elevado leque de sensibilidades das membranas poliméricas foram testados seis compostos plastificantes e seis compostos

aditivos. Na tabela 2 indica-se a composição das membranas. Cada membrana polimérica foi identificada, no sistema de multi-sensores, por um código que corresponde à letra associada ao plastificante e ao número de identificação do composto aditivo usado na sua formulação.

Tabela 2 – Aditivos e plastificantes usados na preparação das membranas poliméricas.

Composto plastificante	Identificação do composto plastificante	Composto aditivo	Identificação do composto aditivo
Ftalato de Bis (2-etil-hexilo)	A	Octadecilamina	1
Adipato de Bis (1-butil-pentilo)	B	Fosfato de Bis(2-etil-hexilo)	2
Fosfato de Tris (2-etil-hexilo)	C	Álcool oleílico	3
Sebacato de Dibutilo	D	Cloreto de Metil-trioctil-amónio	4
2-Nitrofenil-octil-éter	E	Cloreto de Tridodecil-metil-amónio	5
Fosfato de dioctil-fenilo	F	Ácido oleico	6

### 3.6. Análise por multi-sensores

Neste trabalho foram construídos dois sistemas de multi-sensores em corpos cilíndricos de acrílico (diâmetro de 1,5 cm e altura de 6 cm). Cada sistema possui 20 orifícios com diâmetro de 3 mm. Em cada orifício colocou-se um fio eléctrico e preencheu-se o espaço com resina epoxy condutora de prata (EPO-TEK E4110) de forma a deixar uma saliência na superfície do corpo de acrílico (poço). As misturas das membranas poliméricas foram adicionadas, gota a gota, até o poço estar completamente preenchido (Figura1). Em cada sistema adicionaram-se 18 membranas poliméricas diferentes. No primeiro sistema as membranas foram preparadas com combinações entre os seis compostos aditivos e os compostos plastificantes A, B e C. No segundo sistema, as membranas poliméricas foram preparadas a partir de combinações dos seis compostos aditivos e os compostos plastificantes D, E e F. Nos dois poços que sobraram de cada sistema foram repetidas membranas que não mostraram uma aparência cristalina: membrana A2 e A3 para o primeiro sistema e membranas D4 e E4 para o segundo.

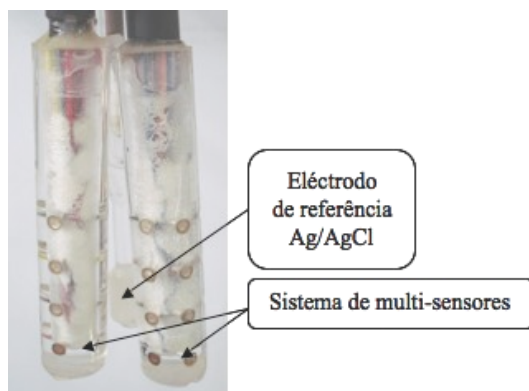


Figura 1 – Língua electrónica: sistema de multi-sensores com o eléctrodo de referência Ag/AgCl.

As medições foram realizadas utilizando os dois sistemas de multi-sensores e um eléctrodo de referência de Ag/AgCl de dupla junção, língua electrónica, conectados a um “multiplexer Agilent Data Acquisition/Switch Unit”, modelo 34970A. Os sinais dos 40 sensores foram adquiridos com o software “Agilent BenchLink Data Logger”. Os dados obtidos foram importados para o Excel onde foram visualizados e pré-tratados para aplicação dos métodos estatísticos multivariados. Todas as experiências foram efectuadas a 25 °C numa célula de vidro duplas paredes. A temperatura foi controlada por um banho termostatzado da marca Selecta Tectron Bio (Figura 2). Todas as soluções foram analisadas durante 10-15 minutos.

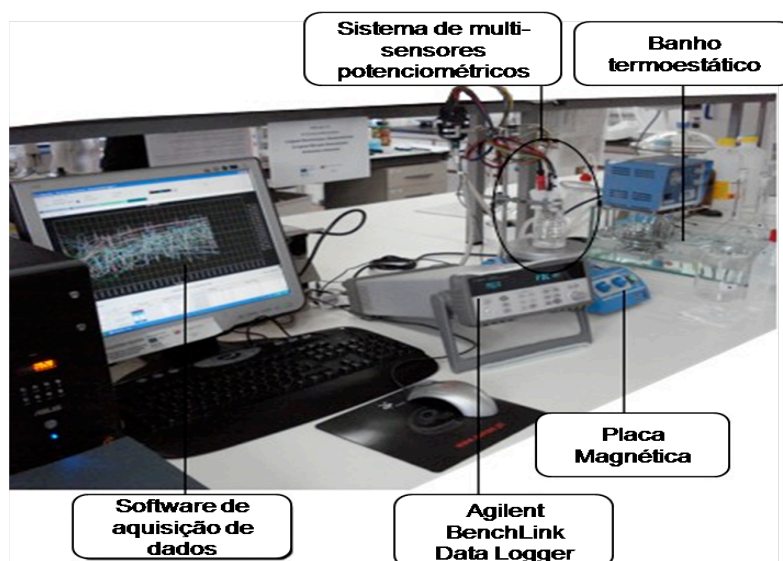


Figura 2 – Montagem experimental para a análise com a língua electrónica

## 3.7. Análise estatística

Os dados experimentais, nomeadamente os sinais obtidos na análise com a língua electrónica e os dados obtidos pela análise cromatográfica, foram tratados com os softwares estatísticos SPSS (versão 17) e “Unscrambler” (versão 9,1). No tratamento realizado foram utilizados diferentes métodos estatísticos multivariados, qualitativos e quantitativos: ACP, ADL, RLM e MQP.

### 3.7.1. Análise exploratória multivariada com ACP

A análise dos componentes principais foi utilizada para verificar se os dados experimentais obtidos por HPLC tinham informação suficiente para diferenciar as bebidas não alcoólicas. As combinações lineares, designadas por componentes principais (CP), são ortogonais entre si e ordenadas por ordem decrescente consoante a fracção de variância dos dados explicada. A primeira CP encontra-se na direcção de maior variância e é o vector próprio associado ao valor próprio mais elevado. A segunda CP é o vector próprio correspondente ao segundo valor próprio mais elevado e assim por diante [27,28]. Este método permitiu obter um conjunto menor de variáveis independentes, que representam a maior parte da informação presente nas variáveis originais. A representação gráfica das novas variáveis derivadas permitiu visualizar a variância explicada das amostras experimentais, bem como a formação de grupos entre as amostras com características químicas semelhantes. Parte da informação obtida com este procedimento estatístico foi usada na classificação das amostras com a língua electrónica. O número de componentes principais a manter no tratamento dos dados foi avaliado pela percentagem de variância total explicada associada ao número de componentes escolhido e pela avaliação dos valores alfa de Cronbach [27,28].

### 3.7.2. Classificação com ADL

Para estudar a capacidade de classificação da língua electrónica, foi utilizado a análise discriminante linear. O objectivo da utilização desta técnica é

a obtenção de regras de diferenciação entre os diferentes sumos. Na ADL é necessário conhecer a que grupo pertence cada amostra do conjunto utilizado. Os pressupostos da ADL incluem o relacionamento linear entre todos os pares de variáveis independentes, a normalidade dentro dos grupos e homogeneidade das variâncias e das matrizes de variância-covariância [27,28]. O teste “Kolmogorov-Smirnov”, com a correcção “Lilliefors”, foi usado para avaliar a normalidade da distribuição dos sinais das membranas poliméricas dentro de cada grupo definido, e o teste “Levene”, a homogeneidade de variância. A estatística M-Box foi utilizada para testar o pressuposto da homogeneidade das matrizes de variância-covariância. A ADL é muito sensível à dimensão das amostras, no entanto, pode-se utilizar neste estudo, visto que é uma técnica bastante robusta quanto à violação dos pressupostos. Quanto maior for o número de amostras mais robusta é a análise, no caso dos pressupostos da ADL não serem verificados [27].

O desempenho da classificação do modelo pode ser estudada usando os grupos de dados originais e a validação cruzada com o procedimento “leaving-one-out”. No primeiro caso, todas as amostras são utilizadas para deduzir as funções lineares de classificação e para testar a habilidade do método obtido, o que pode originar resultados sobrevalorizados. No segundo caso, é retirada uma amostra do conjunto e este é utilizado para deduzir o modelo discriminante, sendo a amostra retirada classificada a partir desta função. Este procedimento é repetido para todas as amostras, ou seja, cada amostra é classificada por um modelo discriminante que foi determinado sem a sua contribuição [27,35,36] Para ambos os procedimentos (análise com grupos de dados originais ou com a validação cruzada), a sensibilidade e a especificidade do modelo discriminante foram calculadas com base no número de indivíduos correctamente classificados no grupo a que pertencem. A sensibilidade foi calculada dividindo o número de amostras classificadas correctamente de um dado grupo pelo número total de amostras pertencentes a esse grupo. A especificidade foi calculada pela divisão do número de amostras classificadas correctamente de um grupo específico pelo número total de amostras, de qualquer grupo, que tenham sido classificadas como sendo daquele grupo [35,36].

Para verificar se as funções são significativas, foi aplicado o teste “Wilks’ Lambda” (quando o valor de  $p < 0,050$ , indica que as funções discriminantes são significativas). Na selecção das variáveis independentes significativas para a discriminação, foi usado o teste da tolerância ( $1-R^2$ ), que corresponde a uma medida da proporção da variância da variável independente que não é explicada pelas restantes variáveis independentes, ou seja, permite avaliar a multicolinearidade das variáveis independentes. Na análise discriminante stepwise foi usado também o teste “Wilks’ Lambda”, com a probabilidade F de 0,05 para a variável ser incluída ou de 0,10 para ser removida do modelo.

### 3.7.3. Quantificação com RLM

A regressão linear múltipla é uma técnica estatística que pode ser usada para obter um modelo de estimação que representa a relação entre uma variável dependente e várias variáveis independentes. Os pressupostos implicam a verificação da linearidade dos dados experimentais, a independência dos erros, a homogeneidade das variâncias dos resíduos, a normalidade de distribuição dos erros e a multi-colinearidade entre as variáveis independentes [27].

A linearidade na relação entre variáveis dependentes e independentes é avaliada pelo gráfico dos resíduos, verificando se os erros são distribuídos aleatoriamente. Aplicando o teste Durbin-Watson é possível verificar a independência dos resíduos, ou seja, que a grandeza de um resíduo não influencia a grandeza do resíduo seguinte; de uma forma empírica, se os resultados deste teste forem próximos de 2 ( $\pm 0,2$ ), é esperado que os erros sejam independentes. Para verificar a presença de diferentes variâncias, utiliza-se a representação gráfica dos resíduos estandardizados e os valores estimados. Se os resíduos se distribuírem de forma mais ou menos aleatória em torno de zero, a variância é constante. O pressuposto da distribuição normal dos erros é averiguado através do gráfico da probabilidade normal. No eixo das abscissas representa-se a probabilidade acumulada dos erros e no eixo das ordenadas, a probabilidade acumulada que se obteria se os erros possuísem distribuição normal. Se os erros da regressão possuírem

distribuição normal, os valores representados neste gráfico devem seguir uma recta com declive próximo de 1. O estudo da colineariedade é efectuado usando os valores de VIF (abreviatura em inglês para “Variance Inflation Factor”); se os valores forem superiores a 5 ou mesmo a 10, é porque existe problemas com multi-colineariedade [27].

Neste trabalho, após a verificação dos pressupostos, foi utilizado o modelo de RLM com o procedimento “Stepwise” com o objectivo de escolher os melhores sensores para a quantificação de acidificantes e açúcares nas bebidas sem álcool. A escolha final das variáveis seleccionadas foi efectuada com base no desempenho do modelo de previsão. Os modelos de previsão foram obtidos por meio do método de validação cruzada, conhecido como “leave-one-out”, onde as amostras são retiradas, uma de cada vez, para serem usadas como teste do modelo de previsão obtido sem a sua presença. O desempenho dos modelos de estimação/previsão foi avaliado por [35]:

- coeficiente de determinação ( $R^2$ ), da representação gráfica entre os valores previstos pelo modelo e os valores esperados, que deve ser próximo de 1;
- o valor de  $EPE_C$  (erro de estimação da calibração) e  $EPP_{VC}$  (erro padrão de previsão da validação cruzada) que deve ser o mais baixo possível (equações definidas no anexo 1);
- declive e ordenada na origem da representação gráfica entre os valores previstos pelo modelo e os valores esperados, que devem ser de 1 e 0, respectivamente.

#### **3.7.4. Quantificação com MQP**

No modelo de regressão obtido pelo método dos mínimos quadrados parciais, as informações das amostras fornecidas pela língua electrónica e as concentrações do composto a prever são usadas ao mesmo tempo para a calibração. O objectivo dos MQP é prever os valores de Y (matriz da variável dependente) a partir de X (matriz das variáveis independentes). Este modelo procura um conjunto de componentes principais que representem simultaneamente a decomposição de X e Y de forma a explicarem o máximo da covariância existente entre X e Y. Depois da escolha das componentes

principais segue-se uma regressão onde a decomposição de  $X$  é usada para prever  $Y$  [26,29]. Ou seja, na aplicação do método MQP define-se o número de componentes principais (variáveis latentes) necessárias para obter o modelo de estimação/previsão. Em geral, o número de componentes principais a seleccionar é definido pelo menor valor da soma dos quadrados dos erros de estimação ( $EPE_c$ , para a calibração) ou de previsão ( $EPP_{vc}$ , para a validação cruzada).

O desempenho de previsão do modelo foi verificado, tal como para técnica RLM, usando os dados originais na obtenção do modelo estimação, através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o erro padrão de calibração ( $EPE_c$ ), e usando o método de validação cruzada, através do valor do coeficiente de determinação para a validação cruzada ( $R^2_{vc}$ ) e o erro padrão de previsão ( $EPP_{vc}$ ). Estes parâmetros permitem também efectuar comparações de desempenho na estimação/previsão dos dois métodos lineares: RLM e MQP. Finalmente, tal como para os modelos RLM, o desempenho do modelo foi também avaliado através do declive e ordenada na origem da representação gráfica entre os valores previstos pelo modelo cujos valores esperados devem ser de 1 e 0, respectivamente [37].

## 4. Resultados

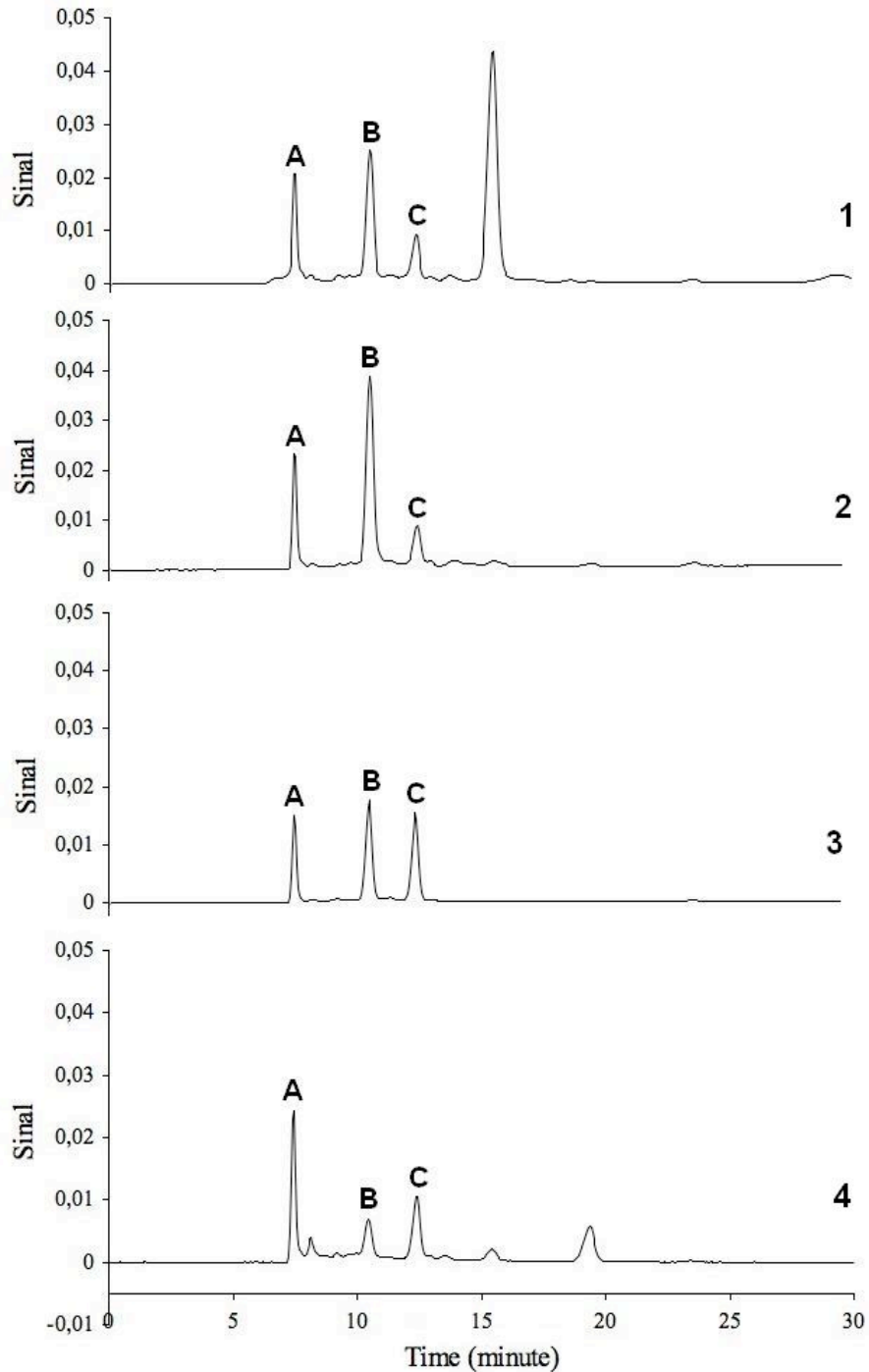
A capacidade da língua electrónica para discriminar bebidas com diferentes níveis de sumo foi avaliada usando bebidas de diferentes marcas. Foram considerados quatro grupos com diferentes níveis de sumo adicionado, sendo cada grupo constituído por quatro bebidas de frutos diferentes (Tabela 2, capítulo 2). Outro objectivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de quantificar acidificantes e açúcares em bebidas não alcoólicas, usando a língua electrónica. Para tal as bebidas foram analisadas usando o HPLC para determinar as concentrações do ácido ascórbico, ácido málico, ácido cítrico, frutose e glucose. Posteriormente os dados experimentais obtidos nas análises com o HPLC e com a língua electrónica, foram tratados com algumas ferramentas estatísticas, tais como, ACP, ADL, RLM e MQP.

### 4.1. Análise por HPLC

A seguir apresentam-se exemplos típicos de cromatogramas obtidos da análise das amostras não alcoólicas por HPLC, com o detector de UV e com o detector de índice de refacção, e mostram-se também os resultados das calibrações obtidas e usadas na quantificação do ácido ascórbico, ácido málico, ácido cítrico, frutose e glucose nas amostras. Posteriormente, usou-se a análise de componentes principais para verificar a variabilidade destes resultados analíticos em relação aos grupos de amostras considerados.

#### 4.1.1. Cromatogramas do HPLC

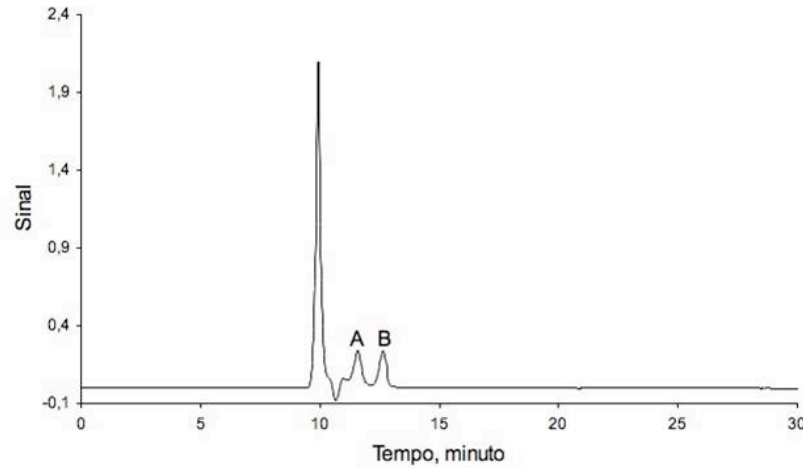
Na Figura 3 mostram-se exemplos de cromatogramas que permitiram identificar e quantificar os ácidos ascórbico, málico e cítrico presentes na maioria das bebidas não alcoólicas. Nesta figura mostram-se exemplos de cromatogramas de cada um dos grupos de bebidas não alcoólicas, estabelecidos anteriormente.



**Figura 3** – Exemplos de cromatogramas de HPLC, obtidos com o detector UV, de cada um dos grupos de bebidas analisadas. Os cromatogramas correspondem: 1) Sumo de Manga “Marca1”; 2) Sumo de Laranja “Marca 2”; 3) Sumo de Ananás “Marca3”; 4) Ice Tea de Pêssego “Marca5”. Os picos quantificados são: (A) ácido cítrico, (B) ácido málico e (C) ácido ascórbico.

Nos cromatogramas obtidos da análise dos açúcares, os picos identificados e quantificados foram os da frutose e da glucose (Figura 4).

Outras substâncias não foram identificadas nos cromatogramas, porque não eram comuns na composição definida nos rótulos da maior parte das amostras.



**Figura 4** – Exemplo típico de um cromatograma de HPLC obtido para a amostra Sumo de Manga “Marca1” com o detector índice de refração. Os picos quantificados são: (A) glucose e (B) frutose.

#### 4.1.2. Calibração do HPLC

A calibração do HPLC foi efectuada com cinco soluções padrão, preparadas no laboratório, com concentrações diferentes de ácido ascórbico, ácido málico, ácido cítrico, frutose e glucose. A informação referente às rectas de calibração, para cada um dos compostos em estudo, está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações das soluções padrão e parâmetros obtidos da calibração.

Compostos analisados	Concentrações g/L	Declive	Ordenada na origem	Coefficiente de Correlação
Ácido ascórbico	[0,01; 0,10]	$3,55 \times 10^{-5}$	$-1,89 \times 10^{-3}$	0,9988
Ácido málico	[0,03; 0,30]	$8,31 \times 10^{-5}$	$-7,65 \times 10^{-2}$	0,9992
Ácido cítrico	[0,04; 0,47]	$1,00 \times 10^{-6}$	$-8,41 \times 10^{-2}$	0,9997
Frutose	[0,20; 6,03]	$3,53 \times 10^{-6}$	$1,24 \times 10^{-5}$	0,9997
Glucose	[0,20; 6,02]	$3,16 \times 10^{-6}$	$9,22 \times 10^{-4}$	0,9996

Todas as calibrações mostraram tendências lineares, em geral, com bons coeficientes de correlação ( $R > 0,999$ ).

Na Tabela 4 apresentam-se os intervalos das concentrações do ácido ascórbico, do ácido málico, do ácido cítrico e dos açúcares nas amostras analisadas no HPLC, para cada um dos grupos. Como se pode verificar, o ácido málico, ácido cítrico, frutose e glucose foram encontrados nas 16 bebidas analisadas, mas o ácido ascórbico só foi detectado e quantificado no grupo 4 e numa bebida do grupo 1. As concentrações de cada um dos ácidos e açúcares, depois da correcção com os factores de diluição, encontram-se globalmente entre: 0,045g/L e 1,89g/L para o ácido ascórbico (não está presente em 68,7% das amostras), 0,41g/L e 2,25g/L para o ácido málico, 0,57g/L e 3,85g/L para o ácido cítrico, 4,93g/L e 40,2g/L para a frutose e 4,49g/L e 65,3g/L para a glucose.

Tabela 4 – Intervalo de concentrações dos açúcares, dos acidificantes e do antioxidante presentes nas bebidas, analisadas por HPLC.

Grupos	Ácido ascórbico g/L	Ácido málico g/L	Ácido cítrico g/L	Glucose g/L	Frutose g/L
1	[n.d.*; 0,08]	[0,41; 2,25]	[1,62; 2,58]	[12,0; 28,0]	[13,9; 27,9]
2	n.d.*	[1,13; 1,32]	[2,14; 3,85]	[11,6; 17,1]	[11,5; 17,1]
3	n.d.*	[1,07; 2,05]	[1,22; 2,20]	[30,4; 65,3]	[17,9; 40,2]
4	[0,045; 1,89]	[0,41; 1,96]	[0,57; 1,63]	[4,49; 19,6]	[4,93; 17,1]

\*) não detectado.

#### 4.1.3. Análise de componentes principais

Utilizou-se a análise dos componentes principais para avaliar a variabilidade dos dados experimentais obtidos por HPLC. Verificou-se que as duas primeiras componentes principais explicavam 76,7% da variabilidade total. A primeira componente (PC1) explica 52,0% da variância total e a segunda componente (PC2), a 24,7%.

Na Figura 5 apresenta-se o gráfico bidimensional da ACP para se perceber qual ou quais variáveis são determinantes para cada componente principal. A figura permite visualizar a proximidade entre indivíduos e

estabelecer as relações entre as variáveis. A figura mostrou que os grupos 3 e 4 são separados pela primeira função componente principal, sendo o grupo 3 separado principalmente pelas variáveis ácido málico, glucose e frutose, enquanto que, o grupo 4 foi caracterizado pela presença de ácido ascórbico na composição destas amostras. Uma amostra do grupo 1 foi situada no “cluster” das amostras do grupo 4, também caracterizada pela presença de ácido ascórbico na sua composição. As amostras do grupo 2 e duas amostras do grupo 1 foram separadas dos grupos 3 e 4 pela segunda função. Esta distinção deve-se ao facto das bebidas dos grupos 1 e 2 conterem as concentrações de ácido cítrico mais elevadas, quando comparadas com as outras bebidas analisadas. Uma das amostras do grupo 1 ficou numa zona isolada caracterizada por uma maior contribuição do ácido málico.

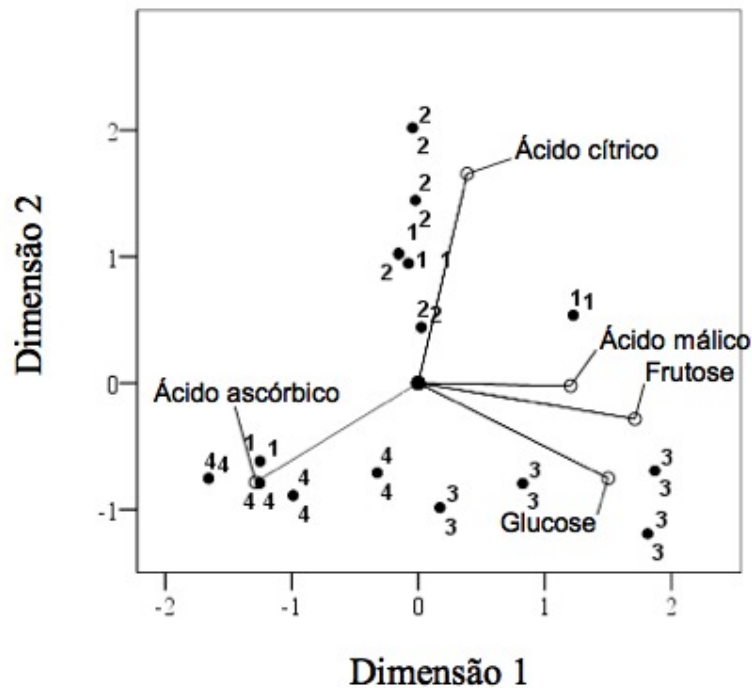


Figura 5 – Gráfico bidimensional da ACP das concentrações do antioxidante, dos acidificantes e dos açúcares presentes nas amostras analisadas por HPLC. As amostras estão identificadas pela numeração do grupo a que pertencem.

Através desta análise observou-se que apenas três dos grupos definidos foram bem separados com os dados analíticos de HPLC. O grupo que não é bem discriminado é o que apresenta maior concentração de sumo de fruta

adicionado (grupo 1). Estas bebidas contêm também polpa de fruta na sua constituição, enquanto as bebidas do outros grupos só têm sumo. Entre as bebidas do grupo 1, a matriz é mais complexa e variável podendo ser esta a razão da maior dispersão das amostras em relação aos outros grupos.

## 4.2. Análise com a língua electrónica

Os perfis dos sinais da língua electrónica obtidos nestas análises mostram, em geral, que não há resultados díspares, o que indica que os sensores responderam de forma comparável para todas as bebidas (Figura 6). As diferenças entre os valores dos sinais foram atribuídas às variações da matriz das bebidas.

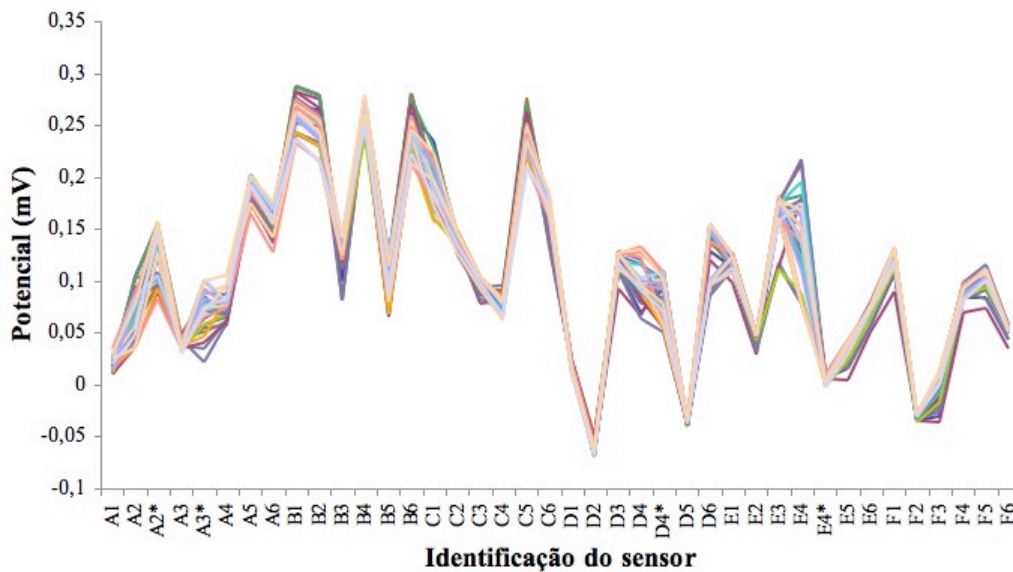


Figura 6 – Perfil dos sinais obtidos nas análises com a língua electrónica  
\*) Repetições das membranas que não mostraram aparência cristalina.

A seguir apresentam-se os resultados da aplicação das ferramentas estatísticas, com o objectivo de efectuar uma avaliação semi-quantitativa dos níveis de sumo de fruta adicionado às bebidas não alcoólicas e a quantificação dos acidificantes e dos açúcares, presentes nas bebidas analisadas.

Neste trabalho, foi utilizada a análise discriminante linear para efectuar uma avaliação semi-quantitativa, ou seja, se os sinais obtidos permitem uma correcta diferenciação entre os quatro grupos de bebidas. Os métodos regressão linear múltipla e mínimos quadrados parciais foram usados para obter modelos de estimação da concentração de acidificantes e açúcares.

#### **4.2.1. Avaliação semi-quantitativa das bebidas não alcoólicas**

Os resultados obtidos da verificação dos pressupostos da análise discriminante linear mostraram que, em geral, estes foram cumpridos (valor de  $p > 0,050$ ), excepto no teste da homogeneidade de variâncias e covariâncias (teste M-Box). A ADL apresenta desempenhos robustos mesmo quando os pressupostos não são cumpridos e, no caso do resultado do teste M-Box, na bibliografia é referido que não deve ser tido em grande consideração uma vez que, é particularmente sensível a pequenos desvios na normalidade multivariada [27]. Todas as variáveis independentes usadas na análise discriminante cumpriam o nível tolerância de  $1-R^2 > 0,6$  e, no caso da análise discriminante linear com o procedimento “stepwise”, apresentavam também resultados significativos no teste “Wilks’ Lambda”. Considerando todos estes aspectos e para confirmar o desempenho da classificação da análise discriminante, os modelos ADL foram obtidos e avaliados usando os grupos de dados originais e usando a validação cruzada com o procedimento “leaving one-out”.

Numa primeira análise foram considerados os sinais de todas as membranas poliméricas que cumpriram o teste de tolerância. O modelo ADL obtido apresentou três funções discriminantes, que explicavam 100% da variabilidade total dos dados experimentais. A primeira função explicava 45,9% da variância, a segunda explicava 30,0% e a terceira, 24,1%. Através do teste “Wilks’ Lambda” verificou-se que só as duas primeiras funções eram significativas (valor de  $p < 0,001$ ), ou seja, que as médias dos grupos nestas funções são diferentes. Na Figura 7 mostra-se a representação gráfica destas duas funções discriminantes, onde se visualiza uma boa separação entre os 4 grupos de bebidas que foram definidos.

Para avaliar o desempenho do modelo na previsão do grupo a que cada amostra pertencia, usou-se também a validação cruzada (em que cada amostra é classificada com as funções de classificação deduzidas sem essa amostra) e verificou-se que apenas 37,5% das bebidas foram bem classificadas. Estes resultados mostram que a capacidade do modelo ADL usado, para classificar as amostras, não era satisfatória.

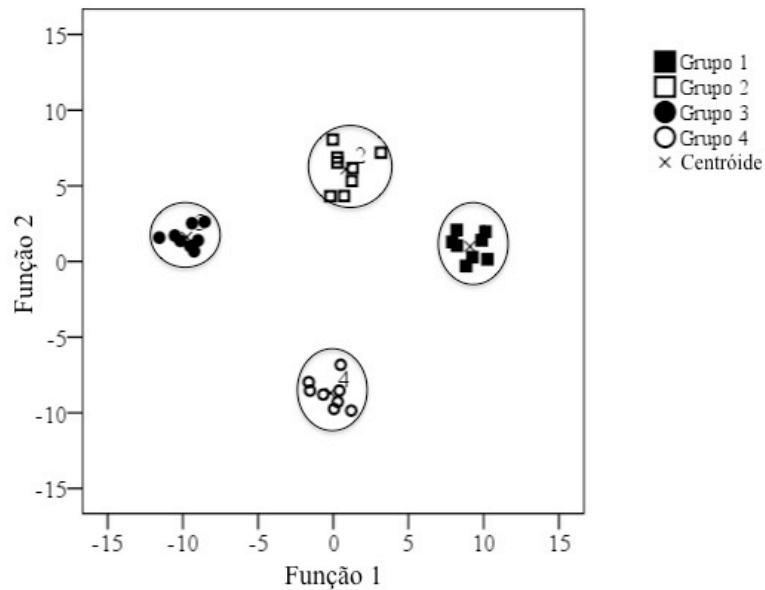


Figura 7 – ADL dos 4 grupos de bebidas com os sinais de todas as membranas poliméricas

Com o intuito de melhorar o modelo aplicou-se a ADL “stepwise”, para seleccionar as membranas poliméricas cujos sinais permitem classificar correctamente as amostras. O modelo obtido tinha três funções discriminantes, a primeira explicava 78,4% da variância dos dados experimentais, a segunda 20,6% e a terceira apenas explicava 1% da variância. A maior proporção da variância é explicada pelas duas primeiras funções e apenas estas são estatisticamente significativas (teste “Wilks’ Lambda” com valor  $p < 0,001$ ). As membranas poliméricas seleccionadas foram quatro: A4, D5, E1 e F5. Neste modelo obteve-se 100% de bebidas classificadas correctamente com os grupos originais, como no modelo anterior. No caso da validação cruzada, obteve-se resultados melhores que no modelo anterior, obtendo-se valor para a especificidade e sensibilidade muito satisfatórios (95 e 93,8%,

respectivamente). Os resultados obtidos para a classificação das amostras de cada grupo considerando o processo de validação cruzada estão apresentados na Tabela 5, bem como, os respectivos valores da especificidade e sensibilidade.

Tabela 5 – Matriz de contingência da classificação dos 4 grupos de bebidas pelo procedimento da validação cruzada

Grupo	Classificação				Sensibilidade (%)	Sensibilidade total (%)
	1	2	3	4		
1	8	0	0	0	100,0	93,8
2	0	8	0	0	100,0	
3	0	2	6	0	75,0	
4	0	0	0	8	100,0	
Especificidade (%)	100,0	80,0	100,0	100,0		
Especificidade total (%)	95,0					

As bebidas que não foram correctamente classificadas foram duas bebidas que pertenciam ao grupo 3 (bebidas de ananás da marca 3 e da marca 4). Estas classificações incorrectas foram consideradas erros aleatórios, uma vez que os dados obtidos da repetição da análise à mesma amostra permitiram classificações correctas. A Figura 8 mostra o efeito discriminante das duas primeiras funções em relação aos 4 grupos de bebidas considerados.

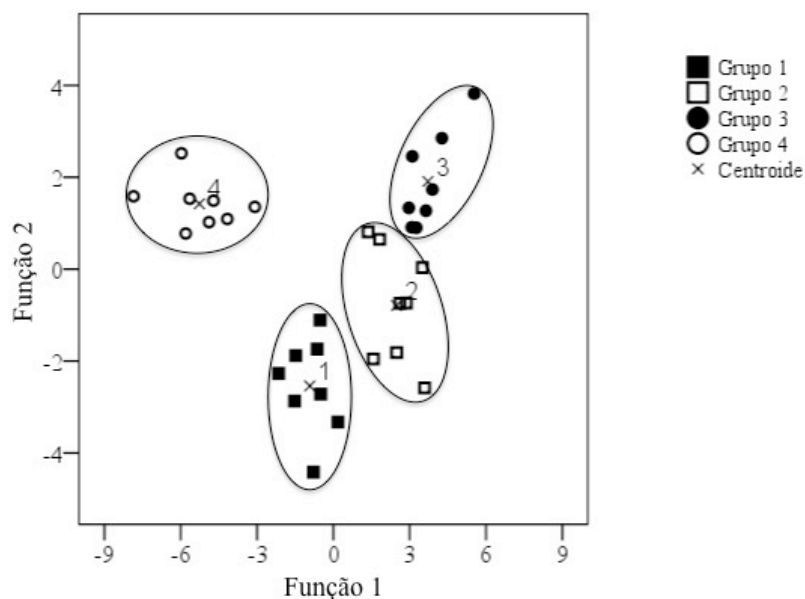


Figura 8 – ADL “stepwise” dos 4 grupos de bebidas não alcoólicas.

Os resultados mostraram que as membranas poliméricas da língua electrónica permitem obter informação sobre as amostras, que pode ser utilizada para efectuar uma análise semi-quantitativa das bebidas não alcoólicas.

#### **4.2.2. Análise quantitativa das bebidas não alcoólicas**

Pretendeu-se investigar se as membranas lipo/poliméricas usadas na língua electrónica também poderiam fornecer informação suficiente para quantificar substâncias predominantes na matriz das amostras. Devido ao pequeno número de amostras envolvidas neste trabalho, os modelos de estimação obtidos foram avaliados por validação cruzada.

Assim, neste estudo pretendeu-se verificar se era possível obter modelos de estimação para o ácido málico, o ácido cítrico, a frutose e a glucose, uma vez que estão presentes em todas as amostras.

Para obter o modelo de estimação das concentrações dos componentes das bebidas em estudo, a informação obtida pelas membranas poliméricas foi processada no software “Unscrambler”, versão 9,1, usando o método RLM e MQP, testado com um até 16 componentes principais. Duas das bebidas do grupo 2 (bebida de laranja e bebida de ananás, ambas da marca 4) não foram usadas nestas análises porque foram consideradas outliers, identificadas por terem resíduos padronizados superiores a 3,5 ou inferiores a -3,5 quando foram estimados por modelos RLM e MQP, obtidos com todos dados.

As 16 membranas poliméricas seleccionadas como sendo as mais significativas para os modelos de estimação e previsão das substâncias quantificadas foram: A2, A3, A5, A6, B1, B2, B3, B5, C2, C3, D3, D4, D5, E2, F2 e F5.

Os modelos foram obtidos de forma a alcançar os mais elevados coeficientes de determinação para a calibração ( $R^2$ ) e para os dados da validação cruzada ( $R^2_{VC}$ ), bem como, para alcançar os mais baixos valores de  $EPE_C$  (erro padrão de calibração) e  $EPP_{VC}$  (erro padrão para a validação cruzada).

Os pressupostos associados à aplicação do método RLM, para obter modelos de estimação/previsão, mostraram serem cumpridos em todos os modelos obtidos (verificação da linearidade dos dados experimentais, a variância ser constante nos resíduos, a normalidade de distribuição dos erros e a independência dos erros), com exceção da multi-colineariedade das variáveis independentes. Este pressuposto foi avaliado usando os valores de VIF que, em geral, são superiores a 10, indicando problemas de multi-colinearidade entre os sinais das membranas poliméricas. Para ultrapassar este problema, todos os modelos RLM foram verificados, no seu desempenho, quer usando os grupos de dados originais quer usando a validação cruzada com o procedimento “leaving one-out”.

Na Tabela 6 são apresentados os coeficientes de determinação e os erros padrão de estimação/previsão das equações dos modelos RLM e MQP obtidas para prever as concentrações do ácido málico, do ácido cítrico, da frutose e da glucose em bebidas não alcoólicas, baseados na informação fornecida pelas membranas poliméricas. Entre parêntesis está colocado o número de funções componentes principais (CPs) usadas em cada um dos modelo MQP.

No caso do ácido málico, nenhum dos modelos lineares testados mostrou ser capaz de estimar a sua concentração em bebidas não alcoólicas ( $R^2 < 0,6$ ) e, por esta razão, este composto não será tido em conta nas próximas análises. De reparar, que a informação quantitativa presente nos sinais das membranas poliméricas para este composto é muito limitada, realçada pela obtenção de um modelo MQP com uma só componente principal.

Em relação aos outros modelos MQP, seleccionaram-se 11 ou 14 factores para a estimação/previsão do ácido cítrico e dos açúcares, respectivamente.

Nos modelos de estimação do ácido cítrico foram obtidos coeficientes de determinação muito bons para os dois modelos lineares ( $R^2 > 0,90$ ), mas pouco satisfatórios na validação cruzada ( $R^2 \leq 0,66$ ), mostrando que ambos os modelos lineares dão fracos resultados de previsão. Aliás, os dois modelos dão resultados muito semelhantes mesmo ao nível dos erros padrão de previsão.

Tabela 6 – Estatísticas dos modelos RLM e MQP seleccionados para a calibração ( $EPE_C$  e  $R^2$ ) e validação cruzada ( $EPP_{VC}$  e  $R^2$ ).

Composto	Modelo	Calibração		Validação cruzada	
		$R^2$	$EPE_C$ , g/L	$R^2$	$EPP_{VC}$ , g/L
Ácido Málico *	RLM	0,58	0,35	0,02	0,74
	MQP (1 CP)	0,10	0,50	0,01	0,58
Ácido Cítrico	RLM	0,92	0,19	0,64	0,43
	MQP (11 CP)	0,92	0,20	0,66	0,41
Frutose	RLM	0,96	1,97	0,84	4,41
	MQP (14 CP)	0,96	1,97	0,84	4,31
Glucose	RLM	0,98	3,18	0,86	7,29
	MQP (14 CP)	0,98	3,18	0,96	3,18

\*) Modelos com fraco ajuste

Os coeficientes de determinação obtidos para a frutose e para a glucose na calibração e na validação cruzada são superiores a 0,84 para ambos os modelos RLM e MQP (modelos bons de estimação e previsão). Numa análise aos erros padrão de estimação e previsão ( $EPEC$  e  $EPP_{VC}$ , respectivamente) pode-se verificar que os dois modelos lineares (RLM e MQP) apresentam desempenhos similares e satisfatórios de estimação da frutose e da glucose (valores de  $EPE_C$  similares), mas distintos na validação cruzada. Neste procedimento, os resultados obtidos de previsão no modelo MQP são mais exactos quando comparados com os valores obtidos no modelo RLM, uma vez, que os  $EPP_{VC}$  são inferiores. Globalmente, no modelo MQP de previsão da glucose obteve-se o maior coeficiente de determinação ( $R^2=0,96$ ) e o menor valor de  $EPP_{VC}$ .

Embora os resultados obtidos para o modelo de estimação/previsão do ácido cítrico sejam muito bom/fraco, respectivamente, e para os modelos da frutose e glucose sejam muito bons/bons, respectivamente, tal como pode ser visualizado nos gráficos apresentados na Figura 9, um processo de validação foi conduzido a fim de testar a quantificação dos modelos obtidos. A validação consistiu em verificar se os valores do declive e da ordenada na origem obtidos da regressão linear entre os valores obtidos dos modelos RLM ou MQP em

função das concentrações esperadas, obtidas por HPLC, podem ser considerados iguais aos teóricos esperados (1 e 0, respectivamente). Os resultados obtidos para os valores de declive e ordenada na origem, bem como, os intervalos de confiança a um nível de significância de 95%, deste procedimento de validação para os modelos RLM e MQP estão apresentados na Tabela 7.

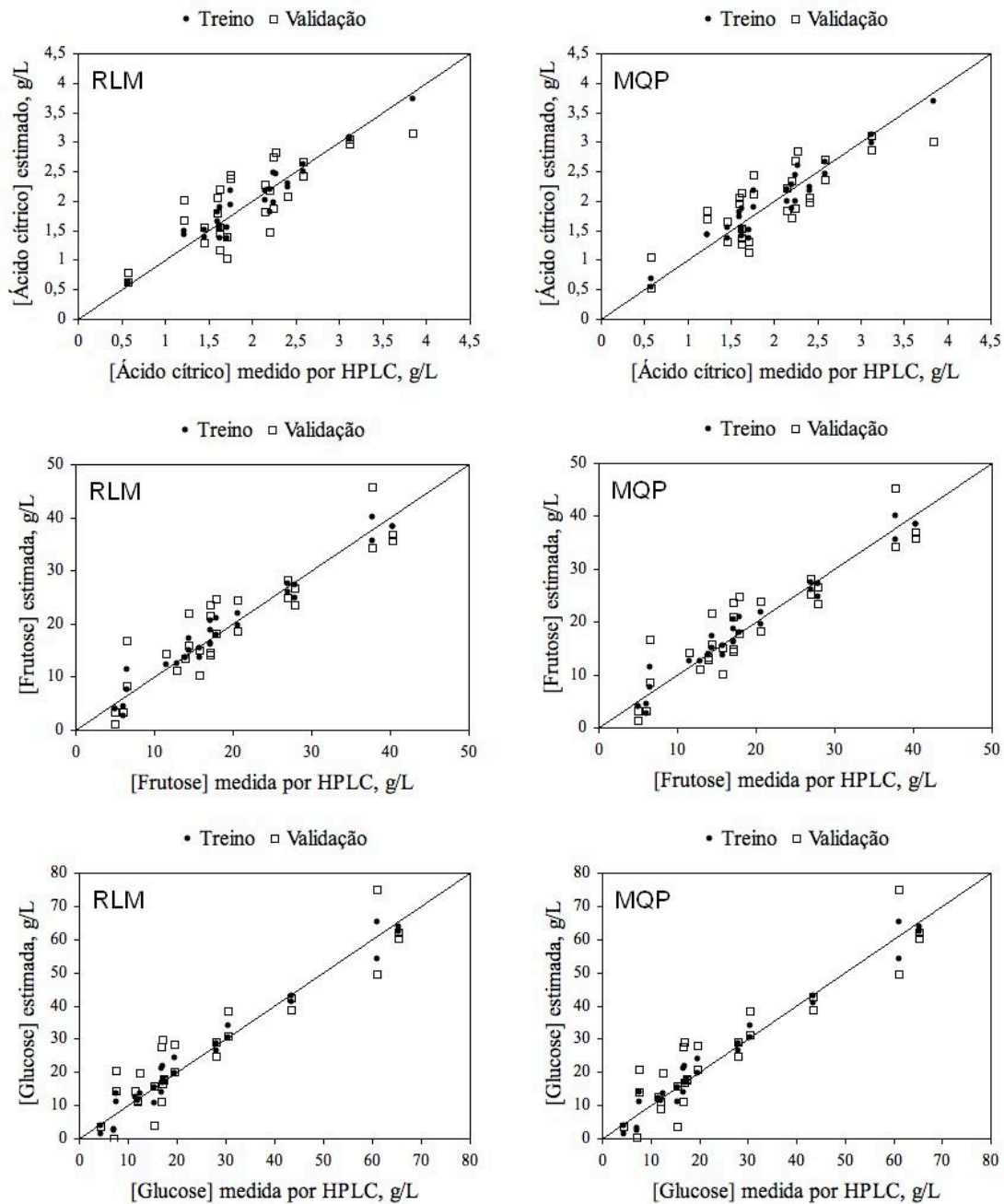


Figura 9 – Concentrações estimadas e previstas do ácido cítrico, frutose e glucose pelos modelos MQP e RLM versus dados experimentais obtidos por HPLC.

Através da análise dos resultados apresentados na tabela podemos considerar que nos modelos de previsão da concentração do ácido cítrico os valores do declive e da ordenada na origem são diferentes dos valores teóricos previstos na validação cruzada pois, os intervalos de confiança dos declives e ordenadas na origem não incluíram os valores esperados (1 e 0, respectivamente). No caso dos modelos da frutose e da glucose, não há evidência estatística (com nível de significância de 5%) que os declives e ordenadas na origem sejam diferentes dos valores esperados teoricamente.

Tabela 7 – Procedimento de validação dos modelos RLM e MQP por comparação entre os valores previstos e os esperados.

Modelo	Parâmetros	Ácido Cítrico		Frutose		Glucose	
		Calibração	Validação cruzada	Calibração	Validação cruzada	Calibração	Validação cruzada
MLS	Declive	0,92	0,76	0,96	0,96	0,97	0,98
	IC declive *	[0,82; 1,03]	[0,54; 0,98]	[0,89; 1,04]	[0,97; 1,12]	[0,90; 1,36]	[0,83; 1,13]
	Ord. Origem	0,15	0,48	0,67	0,9	0,7	0,74
	IC ord. Origem **	[-0,06; 0,36]	[0,03; 0,93]	[-0,86; 2,19]	[-2,57; 4,36]	[-1,26; 2,67]	[-3,84; 5,30]
MQP	Declive	0,92	0,73	0,96	0,96	0,97	0,96
	IC declive *	[0,81; 1,02]	[0,53; 0,93]	[0,89; 1,04]	[0,80; 1,12]	[0,90; 1,04]	[0,81; 1,12]
	Ord. Origem	0,16	0,54	0,67	0,82	0,72	1,17
	IC ord. Origem **	[-0,06; 0,38]	[0,12; 0,96]	[-0,86; 2,19]	[-2,56; 4,20]	[-1,26; 2,70]	[-3,50; 5,85]

\*) Intervalo de confiança do declive

\*\*\*) Intervalo de confiança da ordenada na origem

Os resultados mostrados nas Tabelas 6 e 7 conduzem-nos à aceitação das membranas poliméricas como uma ferramenta passível de ser usada na análise quantitativa de açúcares nas bebidas não alcoólicas. No caso dos acidificantes os resultados não foram satisfatórios, mas com um maior número de amostras, os modelos poderão ser mais robustos e permitirem erros de previsão mais baixos.

A qualidade dos resultados obtidos neste trabalho é semelhante aos obtidos por Beullens et al. (2008), onde aplicou dois tipos de língua electrónica para quantificar individualmente vários compostos padrão de sabores numa solução sintética de mistura [2]. Os autores referiram que, dos dois tipos usados, só a língua electrónica com 18 sensores potenciométricos é que

mostrou ter capacidade de quantificação (não foi referida qual a composição dos sensores usados). Beullens quantificou simultaneamente 7 compostos padrão de sabores incluindo, para o sabor ácido, o ácido málico e o ácido cítrico e, para o sabor doce, a frutose e a glucose [2].

Os resultados do estudo quantitativo com a língua electrónica testada neste trabalho mostram que, tal como no trabalho de Beullens, os declives são próximos de 1 (valores maiores que 0,92) e os valores de correlação são próximos de 1 (valores maiores que 0,92), excepto na validação cruzada do ácido cítrico.

Globalmente, as calibrações e validações são satisfatórias para estimar e prever, respectivamente, os compostos presentes em bebidas não alcoólicas. Neste trabalho, a quantificação foi efectuada sob a acção de efeitos de matriz de diferentes bebidas não alcoólicas e, por isso, está confirmada a capacidade de quantificar compostos pela língua electrónica desenvolvida neste trabalho.

## 5. Conclusão

Com o trabalho realizado pretendeu-se estudar a capacidade das membranas lipo/poliméricas para: avaliar semi-quantitativamente bebidas não alcoólicas, de acordo com as concentrações de sumo de fruta adicionadas e analisar quantitativamente compostos maioritários (acidificantes e açúcares) da matriz destas bebidas.

A informação recolhida pela língua electrónica permitiu efectuar uma correcta diferenciação das bebidas entre os quatro grupos considerados. Esta diferenciação é conseguida com o método estatístico multivariado ADL, usando o procedimento “stepwise”, através de quatro membranas poliméricas, A4, D5, E1 e F5. Este modelo consegue explicar 99% da variabilidade total dos dados experimentais com duas funções discriminantes, que classifica correctamente todas as bebidas em estudo, usando os dados originais, e 93,8% das bebidas na validação cruzada. Com estes resultados pode-se concluir que a língua electrónica, através das membranas poliméricas A4, D5, E1 e F5, pode ser utilizado para efectuar análises semi-quantitativas de níveis de sumo adicionado às bebidas não alcoólicas. Esta capacidade da língua electrónica pode ser usada, por exemplo, na detecção de adulterações e na medição da concentração de sumo de fruta adicionado às bebidas não alcoólicas.

Na análise quantitativa, os dados experimentais das membranas lipo/poliméricas foram tratados com os métodos estatísticos RLM e MQP para a obtenção de um modelo de estimação das concentrações do ácido málico, ácido cítrico, frutose e glucose. Os modelos lineares obtidos apresentaram bons coeficientes de determinação ( $R^2 > 0,84$ ), tanto no grupo de calibração como no grupo de validação cruzada, na previsão das concentrações dos açúcares.

No entanto, para o ácido cítrico, os resultados obtidos foram insatisfatórios para a validação cruzada ( $R^2 < 0,66$ ). Verificou-se também que, para o ácido málico, a informação dos sinais das membranas poliméricas não era suficiente, mesmo para obter um modelo de estimação.

Estes resultados podem ser explicados considerando que os acidificantes são os constituintes de menor concentração em relação aos

açúcares, podendo estar a sua informação nos sinais da língua electrónica, mascarada por estes.

No caso da análise da frutose e glucose verificou-se que a língua electrónica com membranas lípo/poliméricas pode ser utilizada como uma ferramenta analítica para a quantificação destes açúcares nestas bebidas.

Globalmente, este trabalho mostrou pela primeira vez, o desempenho analítico da língua electrónica potenciométrica com membranas lípo/poliméricas na classificação semi-quantitativa de bebidas não alcoólicas de acordo com os níveis de sumo de fruta adicionados e na quantificação de compostos presentes nas bebidas analisadas com o efeito da matriz.

## Bibliografia

- 1) P. R. Ashurst, Chemistry and technology of soft drinks and fruit juice, Blackwell Publishing, 2<sup>a</sup> edição, Hereford (UK), 2005.
- 2) K. Beullens, P. Mészáros, S. Vermeir, D. Kirsanov, A. Legin, S. Buysens, N. Cap, B. M. Nicolaï, J. Lammertyn, Analysis of tomato taste using two types of electronic tongues, *Sensors and Actuators B* 131 (2008) 10–17.
- 3) A. Legin, A. Rudnitskaya, L. Lvova, Y. Vlasov, C. Di Natale, A. D'Amico, Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception, *Anal. Chim. Acta* 484 (2003) 33 – 44.
- 4) S. L. Taylor, Sensory evaluation practices, Elsevier Academic Press, 3<sup>a</sup> edição, USA, 2004.
- 5) Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, Electronic tongues and their analytical application, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 136–146.
- 6) K. Toko, Taste sensor, *Sensors and Actuators B* 64 (2000) 205-215.
- 7) Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, A. D'Amico, Nonspecific sensor arrays (“electronic tongue”) for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry* 77 (2005) 1965–1983.
- 8) J. Wang, Analytical electrochemistry, 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, USA, 2006.
- 9) A. Legin, A. Rudnitskaya, Yu. Vlasov, C. Di Natale, F. Davide, A. D'Amico, Tasting of beverages using an electronic tongue, *Sensors and Actuators B* 44 (1997) 291–296.
- 10) P. Ciosek, W. Wróblewski, The recognition of beer with flow-through sensor array based on miniaturized solid-state electrodes, *Talanta* 69 (2006) 1156–1161.
- 11) A. Legin, A. Rudnitskaya, Yu. Vlasov, C. Di Natale, E. Mazzone, A. D'Amico, Application of electronic tongue for qualitative and quantitative analysis of complex liquid media, *Sensors and Actuators B* 65 (2000) 232–234.
- 12) P. Ciosek, W. Wróblewski, Performance of selective and partially selective sensors in the recognition of beverages, *Talanta* 71 (2007) 738–746.

- 13) A. Rudnitskaya, E. Polshin, D. Kirsanov, J. Lammertyn, B. Nicolai, D. Saison, F. R. Delvaux, F. Delvaux, A. Legin, Instrumental measurement of beer taste attributes using an electronic tongue, *Analytica Chimica Acta* 646 (2009) 111–118.
- 14) L. Lvova, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico, Detection of alcohols in beverages: An application of porphyrin-based Electronic tongue, *Sensors and Actuators B* 118 (2006) 439–447.
- 15) L. A. Dias, A. M. Peres, A. C. A. Veloso, F. S. Reis, M. Vilas-Boas, A. A. S. C. Machado, An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk, *Sensors and Actuators B* 136 (2009) 209–217.
- 16) L. A. Dias, A. M. Peres, M. Vilas-Boas, M. A. Rocha, L. Estevinho, A. A. S. C. Machado, An electronic tongue for honey classification, *Microchimica Acta* 163 (2008) 97 – 102.
- 17) P. Ciosek, B. Pokorska, E. Romanowska, W. Wróblewski, The recognition of growth conditions and metabolic type of plants by a potentiometric electronic tongue, *Electroanalysis* 18 (2006) 1266–1272.
- 18) C. Apetrei, M. L. Rodríguez-Méndez, V. Parra, F. Gutierrez, J. A. de Saja, Array of voltammetric sensors for the discrimination of bitter solutions, *Sensors and Actuators B* 103 (2004) 145–152.
- 19) V. Parra, A. A. Arrieta, J. A. Fernández-Escudero, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. De Saja, Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines, *Sensors and Actuators B* 118 (2006) 448–453.
- 20) F. Winqvist, R. Bjorklund, C. Krantz-Rülcker, I. Lundström, K. Östergren, T. Skoglund, An electronic tongue in the dairy industry, *Sensors and Actuators B* 111–112 (2005) 299–304.
- 21) L. Lvova, E. Martinelli, F. Dini, A. Bergamini, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico, Clinical analysis of human urine by means of potentiometric electronic tongue, *Talanta* 77 (2009) 1097–1104.
- 22) J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, Application of a potentiometric electronic tongue as a classification tool in food analysis, *Talanta* 66 (2005) 1303–1309.

- 23) L. Lvova, A. Levin, Y. Vlasov, G. S. Cha, H. Nam, Multicomponent analysis of Korean green tea by means of disposable all-solid-state potentiometric electronic tongue microsystem, *Sensors and Actuators B* 95 (2003) 391-399.
- 24) P. Gründler, *Chemical sensors. An introduction for scientists and engineers*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2007.
- 25) B. B. Neto, I. S. Scarminio, R. E. Bruns, 25 Anos de Quimiometria no Brasil, *Quim. Nova* 29 (2006) 1401-1406.
- 26) R. G. Brereton, *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, University of Bristol, UK, 2003.
- 27) J. Maroco, *Análise Estatística, com utilização do SPSS*, Edições Sílabo, Lisboa, Portugal, 2003.
- 28) T. Hill, P. Lewicki, *Statistics: Methods and Applications. A Comprehensive Reference for Science, Industry, and Data Mining*, StatSoft, 2006.
- 29) R. Kramer, *Chemometric techniques for quantitative analysis*, Marcel Dekker. Inc., New York, USA, 1998.
- 30) Directiva 2001/112/CE do conselho de 20 de Dezembro de 2001.
- 31) Regulamento nº 360/2008 da Comissão Europeia de 18 de Abril de 2008.
- 32) G. Garilay, Q. Ramírez, L. Munguía, *Biotecnologia Alimentar*, Editorial Limusa, México, 2000.
- 33) T. E. Furia, *Handbook of food additives*, CRC Press, Cleveland, USA, 1980.
- 34) M. C. Boyce, Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* 847 (1990) 369 – 375.
- 35) A. López, P. García, A. Garrido, Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition, *Food Chemistry* 106 (2008) 369–378.
- 36) A. C. Rencher, *Methods of multivariate analysis*, John Willey, New York, 1995.
- 37) V. Ortiz-Somovilla, F. España-España, A. J. Gaitán-Jurado, J. Pérez-Aparicio, E. J. De Pedro-Sanz, Proximate analysis of homogenized and minced mass of pork sausages by NIRS, *Food Chemistry* 101(2007) 1031–1040.

## ANEXO 1

O erro padrão de calibração é dado pela equação

$$EPE_C = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y} - y_i)^2}{n - f - 1}},$$

onde  $\hat{y}$  é obtido testando o modelo de calibração directamente nos dados da calibração e  $f$  é um valor que depende do modelo de regressão usado; no modelo RML,  $f$  é igual ao número de sensores usados na calibração; no modelo MQP,  $f$  é igual ao número de factores (componentes principais) usados na calibração.

O erro Padrão de previsão da validação cruzada é dado pela equação

$$EPP_{VC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{CV,i} - y_i)^2}{n}}$$

onde  $y_{CV,i}$  é o valor previsto para  $y_i$  baseado na equação de calibração obtida sem a amostra  $i$ .