

# **Análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais: aplicação de HPLC-SEC-UV-IR e língua eletrónica**

**Cédric Basílio Sequeira**

*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  
2012**



*Dissertação apresentada na Escola Superior  
Agrária do Instituto Politécnico de Bragança  
para efeito de obtenção do Grau de Mestre em  
Qualidade e Segurança Alimentar.*

*Aos meus pais, Maria da Glória e Francisco*

*À minha namorada, Marta*

*Ao meu irmão, Fernando*

## **Agradecimentos**

*Ao meu orientador, Professor Doutor Luís Dias pelo apoio, disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos.*

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

*Ao Eng. Sá Morais pelo empenho, disponibilidade e ajuda nas análises cromatográficas e, ainda, pelos conhecimentos transmitidos.*

*Ao David Costa, pelo apoio mútuo nas tarefas desenvolvidas.*

*A todos manifesto o meu Muito Obrigado, pela contribuição para a realização desta Tese de Mestrado.*

## RESUMO

Na presente dissertação pretendeu-se estudar a aplicação de HPLC usando a separação por exclusão de tamanhos e dois detetores acoplados em série (ultra-violeta e índice de refração) para análise de acidificantes e antioxidantes (ácido málico, cítrico, tartárico, láctico, acético e ascórbico) e açúcares (glucose, frutose e sacarose) em sumos. Paralelamente aplicou-se uma língua eletrónica com o objetivo de verificar o seu desempenho na classificação dos sumos usando dados semi-quantitativos obtidos por HPLC.

O método HPLC utilizado foi validado, através do estudo da precisão e exatidão, para garantir a qualidade dos dados analíticos. Os resultados obtidos no estudo da precisão com uma solução de controlo de qualidade mostraram ser aceitáveis para todos os compostos para todos os compostos analisados ( $sr\% \leq 5\%$ ) exceto, para o ácido ascórbico e ácido acético relativamente à precisão intermédia. Com uma amostra, os resultados foram aceitáveis para todos os compostos analisados tanto no estudo da repetibilidade como no da precisão intermédia. Os resultados relativos ao estudo da exatidão foram aceitáveis exceto, para o ácido málico e ácido acético. Os resultados mostraram que as soluções a analisar devem ser preparadas no dia para se obter resultados precisos e exatos.

A sacarose, glucose, frutose e o ácido cítrico foram quantificados praticamente em todas as amostras de sumo. O ácido málico e ácido acético foram os compostos mais difíceis de detetar e de quantificar nas amostras de sumos. O ácido tartárico e láctico não foram detetados em nenhuma das amostras de sumos.

Os dados obtidos pela língua eletrónica foram tratados com análise de componentes principais e com análise de clusters, tendo-se verificado resultados semelhantes referentes à variabilidade das amostras em ambos os métodos estatísticos. Posteriormente, recorreu-se à análise discriminante linear "stepwise", com objetivo de estudar a capacidade dos sensores em classificar as amostras em dois grupos formados tendo em consideração um limite de concentração definido para cada composto, atendendo aos níveis de concentrações, desse composto, presentes nas amostras de sumos analisados. O estudo foi realizado para a sacarose, glucose, frutose e ácido

cítrico. Tendo em conta os resultados obtidos da validação cruzada, os sinais obtidos pelos sensores permitiram definir um modelo com melhor desempenho de classificação das amostras de acordo com a presença de glucose,  $\leq 25\text{g/L}$  ou  $>25\text{g/L}$  (97% das amostras foram bem classificadas). O pior modelo de previsão na classificação das amostras foi obtido usando a informação das concentrações de ácido cítrico na formação de dois grupos de amostras ( $\leq 2\text{g/L}$  ou  $>2\text{g/L}$  de ácido cítrico) onde só 80% das amostras foram bem classificadas.

## ABSTRACT

In the present dissertation it was intended to study the application of HPLC by using size exclusion and two detectors coupled in series (ultraviolet and refractive index) for analysis of acidifying and antioxidants (malic, citric, tartaric, lactic, acetic and ascorbic acid) and sugars (glucose, fructose and sucrose) in juices. In parallel, it was applied an electronic tongue to analyze its performance in juices classification using semi-quantitative data obtained by HPLC.

The HPLC method was validated, through the study of precision and accuracy, to guarantee the quality of data analytical. The results obtained in the study of precision (repeatability and intermediate precision) with a solution of quality control proved to be acceptable for all the compounds analyzed ( $sr\% \leq 5\%$ ) except for the ascorbic acid and acetic acid on the intermediate precision; with a sample, the results (relative standard derivation) were all acceptable for all the compounds analyzed. The results for the study of accuracy were acceptable except for the malic acid and acetic acid. The results showed that the test solutions should be prepared on the day basis to obtain precise and accurate results.

Sucrose, glucose, fructose and citric acid were quantified practically in all juice samples. Malic acid and acetic acid were the most difficult to detect and quantify in juices samples. Tartaric acid and lactic acid were not detected in any juice samples.

The data obtained by the electronic tongue were treated with principal component analysis and cluster analysis, and it was found similar results about the variability of samples in both statistical methods. Subsequently, it was used linear discriminant analysis "stepwise", to study the ability of sensors to classify the samples in two groups formed considering a concentration limit for each compound, taking into account the levels of concentration of the compound present in the juices samples analyzed. The study was done to sucrose, glucose, fructose and citric acid. Taking into account the results of the cross-validation, the signals obtained by sensors permitted to define a model with better classification performance of samples based on the presence of glucose,  $\leq 25\text{g/L}$  or  $>25\text{g/L}$  (97% of the samples were well classified). The prediction model for classifying samples into two groups based on citric acid concentration

(with  $\leq 2\text{g/L}$  or  $> 2\text{g/L}$  of citric acid) had the worst results of classification (only 80% of the samples were well classified).

## ÍNDICE

1. OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	2
2.1. Sumos Comerciais .....	2
2.1.1. Tecnologia dos sumos.....	4
2.1.2. Constituintes dos sumos.....	7
2.1.3. Qualidade e segurança dos sumos comerciais .....	11
2.2. Cromatografia líquida de alto desempenho.....	14
2.2.1. Equipamento do HPLC .....	15
2.2.2. Colunas e métodos de separação cromatográficos.....	18
2.3. Língua eletrónica.....	19
2.3.1. Métodos eletroquímicos e aplicações.....	21
2.3.2. Tipos de sensores .....	21
2.4. Métodos quimiométricos .....	22
2.4.1. Métodos não-supervisionados.....	23
2.4.2. Métodos supervisionados .....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1. Reagentes.....	26
3.2. Amostras .....	26
3.3. Preparação de soluções.....	29
3.4. Análises com HPLC .....	29
3.5. Análises com os sensores.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
4.1. Análise por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho usando os detetores IR e UV.....	32
4.1.1. Calibração do sistema de HPLC.....	32
4.1.2. Validação do método de HPLC.....	38
4.1.3. Análise das amostras .....	42
4.2. Análise por língua eletrónica .....	49
5. CONCLUSÃO FINAL.....	59

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades gerais e estruturas químicas: sacarose, frutose e glucose [12].	9
Tabela 2 – Propriedades gerais e estrutura molecular dos ácidos orgânicos analisados nos sumos comerciais [12].	10
Tabela 3 – Descrição dos reagentes usados na preparação das soluções padrão.	26
Tabela 4 – Amostras comerciais analisadas.	27
Tabela 5 - Informação relativa aos sensores usados.	31
Tabela 6 – Intervalo de concentrações das soluções padrão utilizadas na obtenção das curvas de calibração para o HPLC.	34
Tabela 7 – Tempos médios de retenção obtidos na análise de amostras e soluções padrão para o sistema de HPLC.	34
Tabela 8 – Parâmetros obtidos da calibração por regressão linear.	36
Tabela 9 – Equação de calibração referente à presença simultânea de frutose/ácido málico.	38
Tabela 10 – Repetibilidade e precisão intermédia da análise da solução de controlo de qualidade por HPLC.	39
Tabela 11 – Estudo da exatidão da análise da solução de controlo de qualidade por HPLC.	40
Tabela 12 – Estudo da exatidão para três soluções de controlo de qualidade.	40
Tabela 13 – Repetibilidade e precisão intermédia das análises efetuadas à amostra 2 por HPLC.	41
Tabela 14 – Concentrações finais (g/L) dos compostos presentes nas amostras analisadas por HPLC.	43
Tabela 15 – Matriz de contingência da classificação dos dois grupos de amostras pelo procedimento da validação cruzada para a sacarose.	55
Tabela 16 – Matriz de contingência da classificação dos dois grupos de amostras pelo procedimento da validação cruzada para a glucose.	56
Tabela 17 – Matriz de contingência da classificação dos dois grupos de amostras pelo procedimento da validação cruzada para a frutose.	56

Tabela 18 – Matriz de contingência da classificação dos dois grupos de amostras pelo procedimento da validação cruzada para o ácido cítrico. .... 57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de um detetor de índice de refração. ....	16
Figura 2 – Esquema de um detetor de UV. ....	17
Figura 3 – Exemplos de cromatogramas de HPLC obtidos para uma solução padrão de calibração com o detetor IR (1) e detetor UV (2): Sacarose (A), Ácido cítrico (B), Glucose (C), Frutose (D), Glicerol (E), Ácido acético (F), Etanol (G), Ácido cítrico (B´), Ácido málico (H), Ácido ascórbico (I), Ácido láctico (J), Ácido acético (F´) e Pico desconhecido (K). ....	33
Figura 4 – Gráfico de calibração obtido para a glucose por HPLC.....	35
Figura 5 – Concentrações de sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico nas amostras analisadas. ....	46
Figura 6 – Dendogramas para as amostras de sumos e para as concentrações de sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico.....	48
Figura 7 – Gráfico de extremos quartis para os valores de concentração (g/L) da sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico.....	49
Figura 8 – Variação dos sinais de potencial obtidos pelos sensores em função do tempo. ....	50
Figura 9 – Gráfico de extremos e quartis do estudo da variabilidade dos sinais da língua eletrónica obtida na análise às amostras.....	51
Figura 10 – Dendogramas para as amostras de sumos e para os sinais obtidos dos sensores.....	52
Figura 11 – Análise das componentes principais PC1 e PC2 obtido a partir da matriz dos sinais dos sensores referentes à análise das amostras (G1 - grupo 1, G2 - grupo 2, G3 - grupo 3). ....	53

## 1. OBJETIVOS

Neste trabalho pretendeu-se estudar a aplicação de HPLC usando dois detetores acoplados em série: ultra-violeta (UV) e índice de refração (IR), na análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais. Também se pretendeu estudar a potencialidade de uma língua eletrónica, construída com sensores de sensibilidade cruzada e sensores seletivos a iões, em classificar essas amostras de sumos.

Como objetivos específicos pretendeu-se:

- Validar a técnica de HPLC com os detetores UV e IR ligados em série.
- Analisar a composição das amostras de sumos comerciais em açúcares e ácidos orgânicos;
- Classificar semi-quantitativamente as amostras de sumos usando a língua eletrónica.

## 2. INTRODUÇÃO

Na maioria dos países do mundo, as bebidas não alcoólicas, entre elas sumo de frutos, são produzidas com uma larga variedade de sabores, marcas e embalagens [1].

Esta produção tem sido um negócio muito rentável com potencial para crescimento, devido à contínua expansão da variedade de produtos e ao desenvolvimento de novos produtos, como bebidas dietéticas, energéticas ou naturais, de alta qualidade que vão ao encontro da satisfação dos consumidores. Outro fator que contribui para este crescimento é a habilidade e imaginação de quem produz e desenvolve este tipo de produtos associados a equipas de marketing no sector [1].

### 2.1. Sumos Comerciais

Este trabalho incidiu na análise de bebidas comerciais não alcoólicas com adição de sumo de frutos e polpa de fruta.

Segundo a legislação portuguesa existem vários tipos de sumos comerciais que são classificados em: sumos de frutos à base de concentrado, sumos de frutos concentrados, sumos de frutos desidratado/em pó, néctares de sumos, refrigerantes de sumo de frutos, refrigerantes de polme, refrigerantes de, extratos vegetais, refrigerantes aromatizados, entre outros [2, 3].

Os sumos comerciais utilizados como objeto de estudo foram: 1) Sumos de frutos à base de concentrado, 2) Néctares de frutos e 3) Refrigerantes de sumo de frutos. A seguir descrevem-se as características, segundo a legislação portuguesa, de cada um dos tipos de sumos comerciais:

1) **Sumos de frutos à base de concentrado** são definidos como sendo “o produto obtido por reposição num sumo de frutos concentrado da água extraída do sumo durante a concentração e por restituição das substâncias aromáticas e, se for caso disso, da polpa e das células eliminadas do sumo, mas recuperadas durante o processo de produção do sumo de frutos de partida ou de sumo da mesma espécie de frutos” [2].

2) **Néctares de frutos** são referidos como “o produto fermentescível, mas não fermentado, obtido por adição de água e de açúcares e ou mel ao sumo de

frutos, sumo de frutos concentrado, sumo de frutos desidratado/em pó, a polmes de frutos ou a uma mistura destes produtos. A adição de açúcares e ou mel é autorizada em quantidades que não representem mais de 20%, em massa, do produto acabado” [2].

3) **Refrigerantes de sumo de frutos** são descritos como a bebida “... turvo ou límpido, resultante da diluição em água de sumo ou polme de frutos, respetivos concentrados ou desidratados, com um teor de sumo compreendido entre os limites mínimos a seguir indicados (m/m) e a concentração mínima fixada para o néctar do mesmo fruto, podendo conter aromatizantes naturais ou idênticos aos naturais: Ananás, morango, limão, toranja e frutos ácidos diversos – 6%; Laranja – 8%; Alperce e pêsego – 12%; Maçã, pêra e uva – 16%; Outros frutos e misturas de frutos – 10%” [3].

Os sumos de frutos têm um papel muito importante na nutrição humana, pois têm nutrientes que estão presentes em maiores quantidades do que em outros alimentos atribuindo-se-lhes propriedades na saúde humana, como por exemplo, vitaminas e minerais (cálcio, ferro, vitamina A, tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2) e ácido ascórbico (vitamina C)). Os componentes presentes de maior importância são hidratos de carbono e os de menor importância são proteínas e gorduras [1].

É devido à qualidade nutritiva dos sumos que estes são benéficos para a saúde. Outro grupo de compostos provenientes da fruta são os compostos fenólicos, como por exemplo os flavonóides, ácidos fenólicos, tocoferóis e beta-caroteno. Algumas das propriedades destes compostos nos sumos são: ação protetora, principalmente contra algumas doenças respiratórias, atividade antioxidante e influência na circulação do sangue, aumentando a permeabilidade e elasticidade dos vasos [1].

Os sumos de frutos para além de serem uma fonte de potássio, contêm substâncias com alguma atividade farmacológica. Por exemplo, acredita-se que a limonina e outras substâncias limonóides presentes em frutas cítricas têm um efeito anti-cancerígeno. Já o sorbitol, composto presente em muitos sumos de frutos, têm um efeito laxante [1].

Se compararmos o valor nutricional dos sumos, néctares de frutos e refrigerantes é correto afirmar que os sumos são mais nutritivos que os

néctares, uma vez que estes possuem menores quantidades de fruta na sua composição, encontrando-se os refrigerantes em último lugar [4].

A produção de sumos implica um conjunto de várias etapas e processos importantes, que devem ser respeitados para se obter no final um produto de qualidade.

### 2.1.1. Tecnologia dos sumos

A produção de um sumo começa pela matéria-prima, nomeadamente os frutos a partir dos quais se irá obter o respetivo sumo, néctar ou refrigerante, seguindo-se a obtenção do sumo e posterior tratamento e conservação do mesmo. Relativamente à conservação dos sumos, usam-se vários procedimentos tais como: pasteurização, congelamento, armazenamento em atmosferas de gás inerte, concentração e secagem. Alguns destes processos podem ser aplicados aos néctares de frutos e refrigerantes [5].

Para se produzir uma bebida de ótima qualidade é necessário que a matéria-prima utilizada também seja de boa qualidade. Não importa o quanto um processo possa ser eficaz, se a fruta utilizada for de fraca qualidade, o produto final também será de baixa qualidade. A qualidade das frutas depende sobretudo do seu estado de maturação, incluindo a concentração de açúcar (Brix), acidez, teor de amido, cor, sabor e firmeza. Após a seleção das frutas, tendo em consideração estas características, as frutas são lavadas e dependendo do tipo de fruta, esta vai ser descascada, eliminando-se as partes não comestíveis, como o pedúnculo [1, 4, 5].

As etapas anteriormente referidas ocorrem na produção de sumos, néctares de frutos e de refrigerantes. Outros processos posteriores são necessários para a obtenção de cada um dos tipos de bebidas:

1) **Os sumos**, de um modo geral, são o produto obtido da compressão mecânica adequada do(s) fruto(s) utilizado(s) durante a produção. Certos tipos de frutas como por exemplo as maçãs e peras necessitam dum tratamento mecânico associado a um processo envolvendo enzimas com a finalidade de quebrar a estrutura celular para atingir a liquefação. Também pode ser aplicado um processo de difusão ou extração para se obter melhores resultados [1, 5].

Os tratamentos posteriores do sumo têm como objetivos a clarificação, obter um sumo menos turvo, e a estabilização, para evitar o aparecimento de nova turvação. O processo compreende as fases de degradação enzimática das pectinas (e em determinados casos do amido), eliminação de polifenóis por adição de gelatina (sozinha ou em combinação com sílica coloidal ou taninos) e ainda a separação de proteínas por adsorção com bentonite. A clarificação dos sumos é obtida por filtração ou centrifugação [5].

Devido à presença de grandes quantidades de ar no sumo, ao longo do processamento é necessário efetuar a ventilação através da evacuação ou pela injeção de gás inerte, principalmente em produtos sensíveis ao oxigénio [5].

Os sumos vendidos como “não concentrado” são pasteurizados imediatamente após terem sofrido uma compressão, tendo em conta dois objetivos principais: evitar o crescimento de microrganismos (principalmente leveduras e bolores) presentes nas frutas, e suscetíveis de causarem deterioração; permitir destruir as enzimas pectolíticas que estão presentes naturalmente nas frutas e que podem inibir o aspeto turvo natural dos sumos. Porém se um sumo apresentar um aspeto muito claro, como no caso do sumo de maçã ou de framboesa, estas enzimas podem ser adicionadas para acelerar este processo natural [1].

Os sumos concentrados necessitam, em geral, de uma triagem com a finalidade de remover detritos celulares, e de seguida passam por um processo de evaporação de um ou mais estágios para remover a maior parte da água presente e compostos voláteis [1].

Um produto que se possa afirmar como sumo de frutos deve conter 100% de sumo do respetivo fruto [4].

2) **Os néctares de frutos** são obtidos por homogeneização de frutos ou polpa de frutos, com adição de açúcar e água, e em alguns casos, ácidos cítrico e ascórbico. São produzidos principalmente por damascos, peras, morangos, pêssegos e cerejas [5].

Os néctares são submetidos a uma trituração e aquecimento, com o objetivo de inativar as enzimas. A mistura dos frutos é feita de forma adequada com enzimas pectolíticas e celulolíticas de forma a degradar o tecido dos frutos, pela desintegração da protopectina, mantendo as células estruturais intactas. As pectinas altamente esterificadas e com elevado peso molecular, obtidas,

são determinantes para obter produtos com alta viscosidade e com boa estabilidade de turbidez. Por fim, passam por uma triagem, são misturados com os aditivos necessários e são homogeneizados e pasteurizados. Os produtos que são elaborados, por exemplo, a partir de frutas inteiras ou frutas cítricas são obtidos por autoclavagem, triagem e homogeneização [5].

O teor mínimo de sumo e/ou de polme, expresso em percentagem volúmica deve encontrar-se entre 25 e 50% [2, 5].

3) **Os refrigerantes** são feitos a partir de sumos de frutos, misturas de sumos e concentrados, água e, em muitos casos, com adição de sacarose ou glucose, dióxido de carbono e/ou outros aditivos (edulcorantes, antioxidantes, acidulantes, entre outros) [5].

A maioria dos refrigerantes são gaseificados e são os que dominam o mercado a nível mundial. Um refrigerante para ser considerado “gaseificado”, tem que conter um teor de dióxido de carbono superior a 2 g/L [1, 3].

O processo de carbonatação é efetuado por injeção de dióxido de carbono nos refrigerantes, através de difusores localizados nas tubulações ou em tanques de carbonatação. A quantidade de dióxido de carbono injetada nos refrigerantes é um fator de elevada importância pois uma variação dessa quantidade afetará diretamente as características organolépticas do refrigerante, como por exemplo o sabor e aroma, alterando a qualidade do produto final. Os equipamentos de carbonatação são, geralmente, constituídos por três partes distintas: um desaerador responsável pela remoção do oxigénio dissolvido na água utilizada na diluição do xarope composto, um misturador responsável pela mistura de água com xarope composto, e o carbonatador que promove a dissolução do dióxido de carbono no refrigerante [6].

Para além dos refrigerantes gaseificados, também são produzidos refrigerantes não – gaseificados.

Os vários tipos de refrigerantes que existem possuem características em comum, como água (ingrediente predominante), adoçante (normalmente hidratos de carbono), uma certa acidez (o ácido cítrico e ácido málico são os mais comuns), aromatizantes, corantes e conservantes [1].

O teor mínimo de sumo expresso em percentagem volúmica deve encontrar-se entre 6 e 16% [3].

Durante o armazenamento e sob condições adversas (a luz, o aumento da temperatura, o tempo) os compostos nutricionais dos sumos comerciais referidos acima, podem sofrer alterações, por isso é necessário respeitar as disposições legais impostas [1].

Na legislação portuguesa, os sumos e néctares de frutos estão enquadrados pelo Decreto-lei nº 159/90, de 18 de Maio, relativo às regras de composição, fabrico, acondicionamento e rotulagem, posteriormente regulamentado pela Portaria nº 189/91, de 6 de Março, com as alterações contidas nas Portarias nº517/91, de 7 de Junho e nº 59/94, de 25 de Janeiro [2, 7].

No que diz respeito aos refrigerantes, estes devem respeitar as disposições legais abrangidas pelo Decreto-lei nº 288/94, de 14 de Novembro, que foi posteriormente regulamentado pela Portaria nº 703/96, de 6 de Dezembro, relativo às respetivas denominações, definições, acondicionamento e rotulagem [3, 7].

### **2.1.2. Constituintes dos sumos**

Os aditivos são substâncias que são adicionadas intencionalmente durante o fabrico, transformação, preparação, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenamento de um produto alimentar, que podem ter ou não valor nutritivo, que não são normalmente consumidos como alimentos, nem são utilizados como ingredientes típicos dos alimentos. Estas substâncias são adicionadas para cumprirem funções tecnológicas como melhorar a estabilidade, ou as propriedades organoléticas ou nutritivas dos alimentos [8].

Vários aditivos são adicionados aos sumos comerciais, nomeadamente, corantes, conservantes, aromas, edulcorantes, acidulantes, antioxidantes, entre outros.

Os corantes sintéticos são muitas vezes utilizados com o propósito de restaurar a cor de um sumo, em consequência da destruição dos corantes naturais durante o processamento. Um exemplo de um corante natural que se usa nos sumos comerciais é o Beta-caroteno que possui cor amarelo/laranja (E160a) e um artificial é a tartrazina (E102), que proporciona cor amarelo-limão [1].

Os conservantes (como por exemplo o ácido benzóico, málico e sórbico) são utilizados principalmente para inibir o desenvolvimento de certos microrganismos causadores de alterações indesejáveis no sabor e odor de sumos comerciais [1, 9].

O aroma de uma bebida atribui-lhe uma identidade genérica, diferenciando-a das outras. Esta parte do perfil sensorial é responsável por agradar e atrair o consumidor. Os aromas consistem numa mistura de substâncias aromáticas cuidadosamente equilibradas, para satisfazer as percepções sensoriais do consumidor. Exemplos de aromatizantes são: aldeído cinâmico, benzaldeído, vanilina, butirato de amilo, entre muitos outros [1].

Os edulcorantes são utilizados com o objetivo de conferir doçura às bebidas, assim como aos outros produtos alimentares, em substituição da sacarose, e podem ser calóricos ou não. Porém, a maioria das bebidas comerciais, exceto as dietéticas, contêm açúcar como componente maioritário. Os edulcorantes utilizados em sumos comerciais podem dividir-se em duas categorias: os edulcorantes naturais, como a sacarose, xaropes de açúcares (glucose e frutose), xaropes de derivados de milho e mel; e os edulcorantes artificiais, sendo os mais comuns: acesulfame K (E950), aspartame (E951) e o ciclamato de sódio (E952) [1, 9-11].

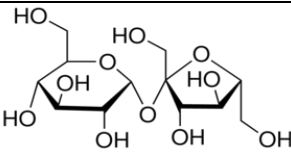
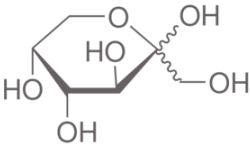
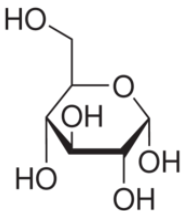
Os sumos comerciais neste trabalho foram analisados na sua composição ao nível dos edulcorantes, acidulantes e antioxidantes. Relativamente aos edulcorantes analisou-se a composição dos sumos em glucose, frutose e sacarose.

A sacarose é um dissacarídeo obtido a partir de cana-de-açúcar ou de beterraba e está disponível em forma de cristais ou líquido [1].

A glucose e a frutose são os principais monossacarídeos presentes nas frutas. Em geral, a glucose está presente em maior quantidade relativamente à frutose, porém nas frutas pomóideas (ex: maçã, pêra, marmelo e nêspera), os principais monossacarídeos continuam a ser a glucose e a frutose, mas neste caso é a frutose que em geral se apresenta em maior quantidade em relação à glucose [8].

Na Tabela 1 mostram-se as estruturas destes compostos assim como, algumas propriedades gerais de cada um.

**Tabela 1 – Propriedades gerais e estruturas químicas: sacarose, frutose e glicose [12].**

Substância	Estrutura molecular	Propriedades
Sacarose		Solubilidade: 204,0g/100g H <sub>2</sub> O (20°C); Dissacarídeo, mais conhecido por açúcar de mesa.
Frutose		Solubilidade: 45,0g/100g H <sub>2</sub> O (20°C); Monossacarídeo encontrado em frutas, cereais, vegetais e mel.
Glicose		Solubilidade: 81,8g/100g H <sub>2</sub> O (15°C); Monossacarídeo encontrado em várias frutas; Monossacarídeo mais importante na biologia.

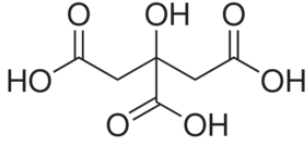
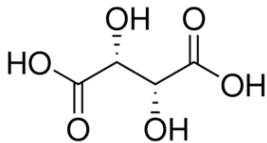
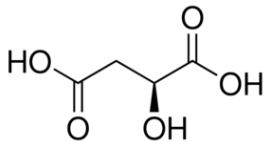
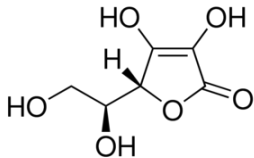
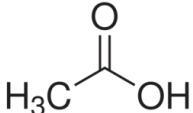
Os acidulantes, juntamente com os edulcorantes, devem proporcionar um sabor agridoce a certos sumos comerciais. Porém, dependendo do composto usado, a adição de certos ácidos orgânicos tem outros fins, como baixar o pH para evitar a degradação por parte de certos microrganismos e podem ser também utilizados como intensificadores de sabor, dependendo dos outros componentes presentes [1, 8, 13].

Neste trabalho, entre os vários ácidos orgânicos, que atuam como acidulantes e antioxidantes, os que foram analisados são os ácidos: cítrico, tartárico, málico, ascórbico e acético.

Na Tabela 2 mostram-se as estruturas destes compostos bem como, algumas propriedades de cada um.

O ácido cítrico é dos acidulantes mais utilizados na indústria de sumos comerciais. É o principal constituinte de vários frutos como: limões, groselhas e arandos (“cranberry”). O ácido cítrico era inicialmente produzido comercialmente a partir de limões, limas ou bergamotas (espécie de tangerina), através do espremimento dos frutos; atualmente é obtido por ação enzimática em glicose e outros açúcares. Este ácido proporciona um sabor ácido e refrescante nas bebidas [1, 5, 8].

**Tabela 2 – Propriedades gerais e estrutura molecular dos ácidos orgânicos analisados nos sumos comerciais [12].**

Substância	Estrutura molecular	Propriedades
Ácido cítrico		Solubilidade: 144g/100g H <sub>2</sub> O (20° C); principal constituinte de vários citrinos; acidulante dos mais usados.
Ácido tartárico		Solubilidade: 138,0g/100g H <sub>2</sub> O (20° C); principal ácido das uvas; sabor forte e amargo.
Ácido málico		Solubilidade: 144,0g/100g H <sub>2</sub> O (26° C); principal ácido das maçãs; confere sabor suave.
Ácido ascórbico		Solubilidade: 33,7g/100g H <sub>2</sub> O (25°C); poderoso antioxidante; propriedades nutricionais.
Ácido acético		Solubilidade em água: totalmente miscível; sabor adstringente; ácido fraco.

O ácido tartárico é um componente natural das uvas, assim como das amoras, groselhas e arandos. É um ácido que proporciona um sabor forte e amargo. O ácido tartárico tem uma baixa solubilidade, o que pode ser um problema em determinadas situações, por isso sempre que possível, é preferível utilizar o ácido cítrico [1, 5].

O ácido málico é muito predominante em maçãs. É o segundo maior ácido, depois do cítrico, que se encontra em frutos cítricos, e confere um maior sabor suave nos frutos, em relação ao ácido cítrico [1, 5]. O ácido málico apresenta-se sob forma de cristais brancos e é altamente solúvel em água [1, 5]. É o acidulante preferido em bebidas de baixas calorias e em sumos de maçã, melhora o sabor e estabiliza a cor em sumos comerciais de frutos, carbonatados e não – carbonatados [1, 5].

A utilização do ácido málico juntamente com o ácido cítrico, é frequente uma vez que está referenciado que melhora as características gustativas mais do que qualquer outro acidulante utilizado individualmente [1, 5].

O ácido ascórbico (vitamina C), é utilizado não só como acidulante, mas também como estabilizador, e as suas propriedades antioxidantes ajudam a preservar a vida de prateleira dos produtos, preservando o sabor. Muitos componentes, como os aldeídos e cetonas, são suscetíveis de sofrerem oxidações, nestas situações, o ácido ascórbico funciona como um escudo protetor, pois será preferencialmente oxidado, e deste modo o sabor e aroma não são afetados. O ácido ascórbico também é eficaz contra reações de escurecimento (processos de oxidação) em sumos não processados, porém o seu efeito pode ser destruído mediante uma pasteurização ou outro tratamento térmico [1, 5].

Por fim o ácido acético não é muito usado nas bebidas, pois contém um sabor muito adstringente (avinagrado). A sua presença em sumos, geralmente em quantidades pequenas, deve-se essencialmente à sua presença em sumo de uva [1, 5].

A composição dos sumos comerciais deve ser controlada para garantir a conformidade dos produtos no que diz respeito à qualidade e segurança.

### **2.1.3. Qualidade e segurança dos sumos comerciais**

A adulteração de sumos de frutos, assim como de qualquer outro produto alimentar, é um problema importante devendo estes produtos serem controlados de forma a garantir a sua qualidade e segurança, ou seja, controlados ao nível químico e microbiológico [1].

A adulteração pode ser feita de várias maneiras como: a diluição excessiva (adição de água em excesso aos sumos), a utilização de ingredientes sólidos mais baratos, a mistura de sumos mais baratos com sumos mais caros e a utilização de aditivos não declarados, muitas vezes para imitar os perfis de composição dos sumos [1, 14, 15].

Para analisar possíveis adulterações por diluição excessiva, a metodologia aplicada por muitos países, tem sido a análise do teor mínimo de sólidos

(medido em grau Brix) [1]. Para os outros tipos de adulterações é necessário usar metodologias analíticas mais complexas e caras.

A detecção de adulterações por adição de açúcares pode ser feita por análise do perfil de açúcares majoritários (sacarose, glucose, frutose) ou de açúcares modificados (por exemplo, açúcares resultantes da transformação da sacarose da beterraba e cana de açúcar e do amido resultante do milho). Nesta tarefa utilizam-se vários tipos de cromatografias, como a cromatografia em placa, a cromatografia líquida com detecção amperométrica e a cromatografia gasosa capilar com detecção por ionização de chama. Também é possível a determinação da origem dos açúcares adicionados através de métodos isotópicos, tendo como interesse o carbono, o hidrogénio e o oxigénio, pois estes três elementos existem em diversas formas isotópicas, que estão presentes na natureza em quantidades conhecidas [1, 16-19].

A presença de oligossacarídeos que são característicos dos açúcares adicionados mas não das frutas são também detetados e quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) [1].

A espectroscopia FT-NIR (Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier) e a análise multivariada PLSR (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais), são duas técnicas que em conjunto permitem quantificar em simultâneo os açúcares (sacarose, glucose e frutose) presentes nos sumos. A espectroscopia FT-NIR permite analisar os açúcares de forma rápida e precisa sem os destruir, e pode ser aplicada no controle da qualidade de bebidas ou na monitorização de adulterações ou contaminações [20].

Outro método eficaz para detetar adulterações por adição de sacarose, tem por base a utilização da técnica Py-MS (Espectroscopia de Massa por Pirólise) juntamente com uma análise multivariada [21].

De um modo geral, os sumos de frutos possuem perfis de ácidos orgânicos distintos, os quais podem ser usados como marcadores de autenticidade [15].

Embora o HPLC permita comparar as proporções da maioria dos componentes dos ácidos, este método é limitado, pois pode-se utilizar como adulterantes ácidos orgânicos sintéticos com as mesmas proporções dos ácidos orgânicos presentes em sumos puros. Face a esta limitação, existem estudos que mostram que a eletroforese capilar pode ser uma escolha acertada na investigação de amostras em meio aquoso, sendo apenas

necessário uma simples diluição das amostras. Esta técnica possibilita a separação dos ácidos orgânicos através da detecção direta por UV a 200 nm. Este baixo comprimento de onda pode ser utilizado quando se trabalha com soluções tampão que não são absorvidos no UV [14, 15].

Também se utilizam métodos enzimáticos para determinar a presença de certos compostos, como por exemplo, o ácido D-málico que não ocorre naturalmente, ou seja, a determinação de alguns compostos são realizados utilizando kits enzimáticos (etanol, ácido acético, ácido D e L-láctico) [1, 22].

A adição de sumos mais baratos aos sumos mais caros também pode ser detetada utilizando o HPLC em determinados componentes específicos. Por exemplo, a adição de baga de sabugueiro ao sumo de morango pode ser detetada por análise das antocianinas, usando HPLC [1].

A contaminação microbiana é outro problema ainda mais sério que está associado aos sumos e a todos os produtos alimentares. A contaminação dos sumos provém geralmente das matérias-primas, ou seja, das frutas e pode ocorrer durante o crescimento, colheita, armazenamento e processamento. As superfícies das frutas frescas são frequentemente contaminadas por leveduras e bolores, sendo as leveduras o grupo mais significativo de microrganismos associados a deterioração de refrigerantes e sumos de frutos. A deterioração ocorre pelo crescimento e produção de subprodutos metabólicos, como por exemplo o CO<sub>2</sub>, etanol e ácido acético, mas pode manifestar-se pela formação de películas e floculação que diminuem a turvação dos sumos [1, 23, 24].

Os bolores são fungos e produzem metabolitos secundários tóxicos, nomeadamente, as micotoxinas que são prejudiciais para a saúde. Certos estudos focam especial atenção na formação de ácido fumárico em sumos de frutos estragados por fungos (principalmente por *Rhizopus stolonifer*). A presença do ácido fumárico pode surgir devido à adição de ácido málico sintético, o que pode indicar uma adulteração, isto quando as análises do ácido D-málico confirmam que o ácido málico não provém de fonte natural [1, 22, 23, 25].

Exemplos de bactérias que estão associadas a deterioração de refrigerantes e sumos são por exemplo a *Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, entre outras [1, 35, 38]. A utilização de frutas muito maduras, danificadas ou contaminadas com material orgânica fecal de

animais levam ao aparecimento de surtos causados por *Salmonelas* e *E. Coli O157:H7* [1, 23, 26].

O controlo da contaminação microbiana nas frutas e nos sumos envolve cuidados a ter em todas as fases de produção, incluindo as práticas de colheita, manipulação, lavagem, refrigeração e armazenamento. Também é indispensável a utilização de conservantes químicos adequados para reduzir a carga microbiana [1, 23].

Novas metodologias para confirmar rapidamente a qualidade e segurança dos produtos alimentares são necessários e, por isso, este trabalho incidiu na otimização do método analítico para simultaneamente analisar açúcares e ácidos orgânicos em sumos por HPLC.

## **2.2. Cromatografia líquida de alto desempenho**

A técnica usada neste trabalho é a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, sigla inglesa de High-Performance Liquid Chromatography). Esta técnica pode ser aplicada na análise de qualquer composto que apresente solubilidade num líquido que possa ser utilizado como fase móvel [27-29]. Alguns exemplos de aplicação do HPLC na análise de compostos de alimentos incluem os ácidos orgânicos, as vitaminas, os aminoácidos, os açúcares, as nitrosaminas, certos pesticidas, os metabolitos, os ácidos gordos, as aflatoxinas, os pigmentos e certos aditivos alimentares [27, 30, 31].

A cromatografia por HPLC apresenta várias vantagens, pois permite automatizar o sistema, reduzir o tempo de análise, efetuar análises qualitativas e quantitativas, bem como, ter reprodutibilidade de dados e boa detetabilidade a diferentes comprimentos de onda [28, 30, 32, 33].

As desvantagens devem-se ao facto do equipamento e a sua manutenção ser dispendiosa, de ser um sistema complexo, apresentar baixa sensibilidade perante alguns compostos e ser dependente da experiência do operador [28, 33].

### 2.2.1. Equipamento do HPLC

O sistema HPLC é constituído por vários componentes: a bomba, o injetor, a coluna, o detetor e o registador ou o sistema de processamento de dados [27, 30, 32].

A bomba distribui a fase móvel através do sistema, normalmente a uma velocidade de fluxo de 1 mL/minuto, de forma controlada, exata e precisa. Os dois principais tipos de bombas utilizadas são as de pressão constante e as de volume constante. As bombas são construídas com materiais resistentes aos solventes orgânicos e às soluções aquosas utilizadas como eluente [27, 30, 32].

O injetor permite injetar a amostra na fase móvel, para posteriormente ser introduzida na coluna. A injeção é efetuada com injetores de válvula. A amostra é injetada na válvula, quando esta se encontra na posição "LOAD", utilizando uma seringa, num orifício externo de volume fixo, que se encontra a pressão atmosférica. Entretanto o eluente flui diretamente da bomba para a coluna a alta pressão. Quando se roda a válvula para a posição "INJECT", o orifício passa a fazer parte da corrente do eluente e a amostra é transportada para o interior da coluna [27, 30, 32].

As colunas correspondem à fase estacionária, isto é, consistem na ferramenta responsável pela separação dos compostos. Em geral, têm 10-25 cm de comprimento e 2,1-4,6 mm de diâmetro interno. As colunas são construídas por aço inoxidável para suportarem elevadas pressões e são revestidas por vidro para evitarem possíveis reações que possam ocorrer entre o metal e o solvente [27, 30, 32].

É também fundamental referir a importância das pré-colunas, porque protegem as colunas de HPLC dos danos de contaminantes químicos e micropartículas sem alterar os resultados cromatográficos. Esta proteção pode levar ao aumento da vida útil da coluna. Num sistema de HPLC, as pré-colunas situam-se antes das colunas analíticas [27]. Mais à frente faz-se uma descrição pormenorizada do tipo de coluna usada neste trabalho e dos fenómenos de separação associadas à coluna para a análise de açúcares e ácidos orgânicos.

O detetor controla a sensibilidade com que cada composto pode ser detetado e medido, depois de separados na coluna. O detetor deve ser capaz

de responder às mudanças de concentração em todos os compostos de interesse, com sensibilidade suficiente para medir o composto de menor concentração. A seleção do detetor mais apropriado para análise depende do tipo e da concentração do soluto, da sensibilidade, da amplitude linear e da compatibilidade do detetor com o eluente e o modo de eluição a utilizar [27, 29, 30].

Existem seis tipos principais de detetores utilizados em HPLC que são os de índice de refração (IR), ultravioleta (UV), fluorescência (FL), eletroquímico (EC), condutividade (CD) e espectrometria de massa (MS) [27, 30].

Neste trabalho usam-se dois detetores ligados em série: **1)** o índice de refração (IR); **2)** o ultravioleta (UV).

**1)** O detetor de índice de refração não é seletivo e, geralmente, é utilizado para complementar o detetor de ultravioleta. Este detetor mede a variação do índice de refração da fase móvel, causada pelos analitos dissolvidos (Figura 1). O sinal é mais intenso quanto maior for a diferença entre os índices de refração da amostra e do eluente. A detecção deve ser efetuada com a escolha do eluente mais apropriado [27, 32].

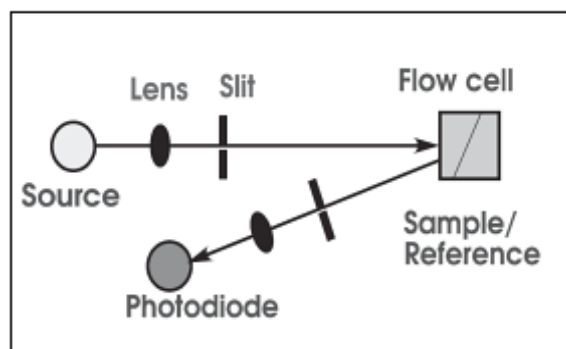


Figura 1 – Esquema de um detetor de índice de refração.

Este detetor proporciona um método de detecção quase universal mas é menos sensível que outros detetores mais específicos, (por exemplo, mil vezes menos sensíveis que os de ultravioleta). Outras desvantagens são atribuídas à sua sensibilidade a mudanças de temperatura, mudanças de pressão, à presença de gases dissolvidos e à composição do eluente [27, 30, 32]. O detetor de índice de refração é amplamente utilizado na análise de analitos que não contenham cromóforos que absorvam no ultravioleta, tais como os hidratos

de carbono e os lípidos. Já o detector de ultravioleta é capaz de medir a radiação de compostos que contenham cromóforos, tais como cetonas, compostos conjugados e aromáticos, e uma série de iões e complexos inorgânicos [27, 29].

2) O detector de ultravioleta é o mais utilizado em HPLC por ser bastante sensível, possuir um vasto intervalo dinâmico, ser pouco afetado por variações de temperatura, ser adequado na eluição de gradiente e ser seletivo (Figura 2). A absorção ocorre num comprimento de onda acima de 200 nm, desde que a molécula contenha pelo menos: uma dupla ligação adjacente a um átomo com um par de elétrons isolado; iodo, bromo ou enxofre; um grupo carbonilo; um grupo nitro; duas ligações duplas conjugadas; um anel aromático, e ainda incluindo iões inorgânicos [30, 32].

A absorvância é proporcional à concentração e obedece a Lei de Beer – Lambert que é definida como:

$$\text{Absorvância} = \log I_0/I_t = \epsilon bc$$

em que  $\epsilon$  corresponde ao coeficiente de absorvidade,  $c$  corresponde à concentração do soluto e  $b$  corresponde ao percurso ótico da célula [30, 32].

A sensibilidade e a resposta diferem para diferentes analitos, dependendo dos cromóforos que possuem. No entanto, a Lei de Beer – Lambert é uma lei limitada porque, por exemplo, a curva da absorvância/concentração é geralmente linear apenas em faixas de baixa concentração e a lei é válida apenas para radiação monocromática [30, 32].

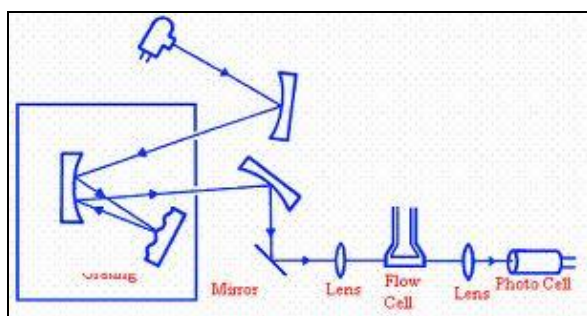


Figura 2 – Esquema de um detector de UV.

Por fim, os registradores, integradores e computadores processam e armazenam o sinal adquirido do detector permitindo exibir e reprocessar a

informação obtida como, por exemplo, as áreas dos picos, as áreas como percentagem da área total e os tempos de retenção de cada um dos compostos analisados. Caso se utilize padrões, estes podem ser usados também para calcular as concentrações dos analitos [27, 29].

### **2.2.2. Colunas e métodos de separação cromatográficos**

Dentro da coluna ocorrem fenómenos que definem o tipo de cromatografia em questão. Segundo Quattrocchi *et al*, a cromatografia pode ser classificada por afinidade e por tamanho molecular [34]. Em relação aos métodos por afinidade encontram-se a cromatografia de fase normal, de fase ligada e de troca iónica. No que diz respeito ao tamanho molecular temos a cromatografia por exclusão de tamanhos e a cromatografia de filtração em gel. Na cromatografia por afinidade o analito interage direta ou indiretamente, através do solvente, com a fase estacionária, enquanto na separação por tamanho molecular não existe (pelo menos teoricamente) nenhuma interação com a fase estacionária [34].

Neste trabalho utilizou-se uma coluna Supelcogel C-610H de 30 cm x 7,8 mm DI. Esta coluna é constituída por uma resina de poliestireno divinilbenzeno e é preparada especificamente para análise de ácidos orgânicos por troca iónica. Porém também é ideal para a separação de açúcares, álcoois, e outros produtos de fermentação (utilizando um detetor de índice de refração), tornando-se uma coluna de HPLC versátil para análise de alimentos e bebidas. Os ácidos orgânicos e hidratos de carbono podem ser facilmente isolados, com uma simples fase móvel isocrática (a composição da fase móvel não se altera ao longo do processo) [35].

A cromatografia de troca iónica utiliza as diferentes afinidades iónicas das amostras entre a fase móvel e a fase estacionária da coluna, ou seja, usa o grau de ionização da coluna e dos compostos para efetuar a separação. Os compostos com carga iónica oposta à da coluna são atraídos e fixados à mesma. Os grupos funcionais que conferem à coluna a sua capacidade de separação podem ser de dois tipos: aniónico quando o grupo funcional é um amónio quaternário ( $-N^+R_3$ ) e catiónico quando o grupo funcional é um ácido sulfónico ( $-SO_3H$ ). Uma coluna que contenha uma resina de troca catiónica é

usada para separar catiões e uma coluna que contenha um material de troca aniônica é usada para separar aniões. Antes uma coluna polimérica usada em cromatografia de troca iônica não tolerava grandes pressões ou solventes orgânicos, mas recentemente as colunas são mais reticuladas e possuem mais tolerância a pressões mais elevadas. Uma variedade de substratos têm vindo a ser utilizados, tais como: poliestireno reticulado, celulose e sílica [29, 30, 36].

A cromatografia por exclusão de tamanhos baseia-se na diferença de penetração das moléculas numa amostra na fase estacionária, permitindo separar as moléculas de acordo com o tamanho. Esta técnica utiliza para esse efeito, fases estacionárias que contêm poros com um diâmetro comparável ao das espécies quando estas se encontram dissolvidas na fase móvel. A velocidade de migração de compostos, pertencentes à mesma família de moléculas, vai depender da sua massa molecular. É indispensável no campo da separação de macromoléculas naturais, mas não é a técnica mais adequada para diferenciar moléculas pequenas ou médias [30, 32, 37, 38].

A cromatografia por exclusão de tamanhos designa-se por filtração em gel quando a fase estacionária é hidrofílica, ou seja, a fase móvel é aquosa, e de permeação em gel quando a fase estacionária é hidrofóbica, ou seja, a fase móvel é um solvente orgânico. Na filtração em gel, utilizam-se fases estacionárias poli-hidroxiadas à base de álcoois polivinílicos puros ou copolimerizados com poliglicerol metacrilato e a fase móvel são soluções aquosas. Na permeação em gel, a fase estacionária mais comum é um polímero de estireno – divinilbenzeno e a fase móvel é um solvente orgânico [34, 37].

São constituídas por polímeros orgânicos ou inorgânicos reticulados em forma de grãos esféricos com 3 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com poros compreendidos entre 4 e 200 nm. Estes materiais, geralmente designados por géis, devem resistir ao efeito de esmagamento derivado da pressão da coluna e devem também resistir a temperaturas superiores a 100°C [37].

### **2.3. Língua eletrónica**

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm surgido na literatura descrevendo a aplicação de línguas eletrónicas na análise de alimentos (sobretudo alimentos

líquidos). Na análise de alimentos, são utilizadas várias metodologias tradicionais na determinação ou detecção de compostos característicos dos alimentos. Estes métodos tradicionais apresentam boa precisão, boa exatidão e confiança, porém são destrutivos, requerem equipamentos dispendiosos, são mais demorosos e são inadequados para se monitorizar no local. Em solução a estes problemas, as línguas eletrônicas têm aparecido como uma ferramenta de fácil utilização, muito promissoras na avaliação da qualidade dos alimentos, especialmente em situações em que apenas se requer informação qualitativa ou semi-quantitativa. Para além disso as amostras não necessitam de um tratamento prévio [39-41].

Estes dispositivos consistem num conjunto de sensores que podem ser considerados instrumentos analíticos que artificialmente reproduzem a sensação do sabor, imitando as línguas biológicas. Nestas últimas, as substâncias responsáveis pelo sabor são recebidas pelas células sensoriais das papilas gustativas da língua, que convertem a informação num sinal elétrico, que permite ao cérebro reconhecer as sensações básicas do paladar, que são o doce, o ácido, o amargo, o salgado e o umami (palavra japonesa para delicioso) [39, 42, 43].

O sistema de multisensores de uma língua eletrônica funciona de maneira semelhante à língua humana. Quando é imersa num líquido obtém-se um padrão de sinais elétricos que variam de acordo com o líquido analisado, que conseqüentemente irá ser decomposto em informação qualitativa ou quantitativa. Denomina-se de seletividade global, esta capacidade de agrupar a informação adquirida [41, 44].

As línguas eletrônicas são caracterizadas por serem não-específicas, de baixa seletividade e por possuírem sensores químicos de elevada estabilidade e sensibilidade cruzada. Outros sistemas de multi-sensores incluem sensores seletivos a iões além dos de sensibilidade cruzada, chamando-se de línguas eletrônicas híbridas. O objetivo principal das línguas eletrônicas é a análise qualitativa (como por exemplo, o reconhecimento, classificação ou identificação de amostras) dependendo da composição da matriz de sensores e do método matemático usado no tratamento de dados. Mas o sistema também possibilita a determinação quantitativa da concentração de vários compostos [39-41].

As línguas eletrônicas podem basear-se em diferentes princípios eletroquímicos usados na medição do sinal dos sensores [40].

### **2.3.1. Métodos eletroquímicos e aplicações**

As línguas eletrônicas funcionam de acordo com diferentes métodos eletroquímicos, sendo o potenciométrico e o voltamétrico, os mais utilizados. A voltametria consiste na aplicação de um potencial crescente (ou decrescente) numa célula até que ocorra a oxidação (ou redução) da substância a analisar, e que corresponde a uma subida (ou descida) do sinal da corrente, sendo o tamanho do pico de corrente diretamente proporcional à concentração do material eletroactivo. Neste trabalho, o método utilizado foi o potenciométrico, que se baseia na medição do potencial de uma célula na ausência de corrente, sendo proporcional ao logaritmo da concentração da substância a determinar [39, 45].

Na área alimentar, as línguas eletrônicas potenciométricas têm sido usadas na distinção de bebidas e alimentos, na deteção de contaminantes em água, na classificação de vinho e mel, identificação de adulterações no leite e na quantificação de sabores e alguns compostos [39, 40, 43, 46- 48].

As línguas eletrônicas voltamétricas também são capazes de identificar adulterações no vinho, monitorizar processos de lavagem no processamento do leite e distinguir as diferentes origens do leite [49, 50].

Existem vários tipos de sensores que podem ser utilizados nas línguas eletrônicas, nomeadamente sensores de: membranas lipo/poliméricas, membranas de vidro-calcogênio e membranas poliméricas seletivas a iões [39-41].

### **2.3.2. Tipos de sensores**

O estudo do paladar não se deve basear em substâncias específicas mas sim no conjunto destas como um todo, para que se possa determinar a intensidade e a qualidade do sabor, e por esta razão, como já referido acima, uma língua eletrônica possui como características principais a sensibilidade e estabilidade, sendo a seletividade um parâmetro de menor interesse. Estas

características são obtidas através do uso de sensores químicos não específicos ou de baixa seletividade e de sensibilidade cruzada para diferentes espécies existentes na matriz de qualquer solução líquida [40- 42].

Nestes tipos de sensores utilizam-se sensores de membranas poliméricas ou de vidro-calcogênio, e os trabalhos realizados com línguas eletrônicas que integram estes dois tipos de membranas são, geralmente, de natureza qualitativa [40, 44, 46, 48, 51]. Em outros trabalhos são referidas línguas eletrônicas constituídas por membranas poliméricas com seletividade genérica e seletivas a iões. Esta combinação possibilita obter informação geral ou seletiva sobre a amostra, possibilitando em alguns trabalhos realizar análise quantitativa, além da qualitativa [41, 51].

O uso de línguas eletrônicas para análise quantitativa encontra-se descrito em muitos poucos trabalhos. Alguns trabalhos que podem ser citados são: medição quantitativa de substâncias orgânicas no vinho, tais como etanol e ácidos orgânicos, com uma língua eletrônica constituída por membranas de vidro-calcogênio [46]; simulação do envelhecimento de sumos usando um sistema de multi-sensores com membranas de vidro-calcogênio e membranas convencionais de elétrodos seletivos a iões [52].

Neste trabalho utilizou-se uma língua eletrônica potenciométrica de membranas lipo/poliméricas e membranas poliméricas seletivas a iões.

Após obter-se os perfis de sinais registados pelas línguas eletrônicas, o tratamento destes é feito recorrendo à análise multivariada.

## **2.4. Métodos quimiométricos**

A análise de dados é fundamental na realização de trabalhos experimentais, sendo univariada quando apenas uma variável é medida sistematicamente em várias amostras. Há muito tempo a estatística univariada tem sido aplicada a problemas químicos, mas a sua utilização tornou-se limitada. Como solução, nas últimas décadas, introduziu-se a estatística multivariada para tratamento de dados químicos, dando origem à quimiometria. O modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma maior quantidade de informação [53].

Neste trabalho, utilizaram-se dois tipos de métodos quimiométricos: métodos multivariados não supervisionados (análise de clusters e análise dos componentes principais) e métodos multivariados supervisionados (análise discriminante linear).

#### **2.4.1. Métodos não-supervisionados**

Nos métodos de análise não-supervisionados, os grupos não são pré-estabelecidos.

**Análise de Componentes Principais (ACP)** é uma técnica de análise multivariada que transforma um conjunto de variáveis correlacionadas num pequeno conjunto de variáveis independentes que são combinações lineares das variáveis originais, denominadas de "componentes principais" [54].

O objetivo principal da ACP é o estudo e interpretação da estrutura da variância-covariância de um determinado facto calculado por múltiplas variáveis de modo a mostrar as relações entre as variáveis, entre os sujeitos ou entre os sujeitos e variáveis. Além disso, é um método de redução dos dados e permite sintetizar a informação de várias variáveis correlacionadas em uma ou mais combinações lineares independentes, que contêm a maioria da informação presente nas variáveis originais [54].

Para além da utilização formal, a ACP pode também ser usada, por exemplo, na identificação de possíveis "outliers", e ainda, na identificação de grupos de indivíduos (clusters) de uma forma evidente.

As componentes principais podem também ser utilizadas em técnicas estatísticas (por exemplo a análise de Clusters e Regressão linear múltipla) que exigem que as variáveis em estudo sejam independentes [54].

**Análise de Clusters** é um procedimento estatístico que pode ser usado para classificar objetos por observação das semelhanças e diferenças entre eles, ou seja, é uma técnica exploratória de análise multivariada que permite agrupar sujeitos ou variáveis em grupos homogêneos ou compactos, relativamente a uma ou mais características comuns. Cada observação pertencente a um determinado grupo é idêntica a todas as outras referentes a esse mesmo grupo, mas diferente das observações relativas aos restantes grupos. A análise

de Clusters foi efetuada, usando o método hierárquico. As técnicas hierárquicas recorrem a passos sucessivos de agregação dos sujeitos considerados individualmente, por exemplo, cada sujeito é um Cluster e depois estes vão sendo agrupados de acordo com as suas proximidades, neste caso os métodos dizem-se aglomerativos, ou pelo contrário todos os sujeitos são, à partida, agrupados num único Cluster e depois são divididos em subgrupos de acordo com as suas medidas de distância, neste caso os métodos dizem-se divisivos [54].

A medida de semelhança e de distância utilizada na análise de Clusters foi a distância euclidiana. Esta medida de diferença métrica mede o comprimento da reta que une duas observações num espaço  $p$ -dimensional. Para  $p$ -variáveis, a distância euclidiana entre os sujeitos  $a$  e  $b$  é dada pela equação:

$$D_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

onde  $x_{ik}$  é o valor da variável  $k$  no sujeito  $i$  e  $x_{jk}$  é o valor da variável  $k$  para o sujeito  $j$ .

#### 2.4.2. Métodos supervisionados

Nos métodos de análise supervisionados, os grupos são pré-estabelecidos.

**Análise discriminante linear (ADL)** é uma técnica de estatística multivariada aplicável quando a variável dependente é qualitativa (grupos) e as variáveis independentes são quantitativas. Esta técnica permite identificar as variáveis que distinguem um ou mais grupos de indivíduos diferentes do ponto de vista estatístico. Posteriormente, as variáveis são usadas para obter uma ou mais funções discriminantes que tornam possível a diferenciação dos grupos estabelecidos. Com esta informação é possível classificar a que grupo pertence novos casos. É muito importante selecionar adequadamente as variáveis para se obter uma boa classificação, pois, o uso de toda a informação disponível pode levar à introdução de ruído e ao agravamento de problemas, como por exemplo, uma maior sobreposição de grupos [54].

A análise discriminante "Stepwise" é um método de análise designado por passo-a-passo, uma vez que as variáveis vão sendo adicionadas ou removidas ao longo dos passos realizados, ou seja, a variável é adicionada quando aumenta a capacidade da função discriminante ou removida quando a capacidade da função discriminante não é afetada pela remoção dessa variável [54]. Neste trabalho usou-se a técnica "stepwise" usando a eliminação por remoção ("backward elimination") que consiste em considerar inicialmente todas as variáveis no modelo e, posteriormente, as que menos contribuem são eliminadas.

A seguir apresenta-se a componente material e métodos referentes ao trabalho laboratorial executado neste trabalho.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Reagentes

Todas as soluções usadas neste trabalho foram preparadas com água desionizada de qualidade tipo II.

O eluente para análise cromatográfica foi preparado com o ácido orto-fosfórico da Panreac. Todos os reagentes usados neste trabalho são de qualidade “para análise”.

Na Tabela 3 mostram-se os compostos usados neste trabalho para a preparação das soluções padrão usadas na calibração do HPLC, bem como, a marca.

**Tabela 3 – Descrição dos reagentes usados na preparação das soluções padrão.**

<b>Composto</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Marca</b>
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Panreac
Frutose (D)	$C_6H_{12}O_6$	Fluka
Glucose (D)	$C_6H_{12}O_6$	Fluka
Ácido cítrico (mono-hidratado)	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Fisher Scientific
Ácido Tartárico (L)	$C_4H_6O_6$	Riedel-deHaen
Ácido málico (DL)	$C_4H_6O_5$	Fluka
Ácido ascórbico (L)	$C_6H_8O_6$	Panreac
Ácido Láctico	$C_3H_6O_3$	BHD
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	Fluka

#### 3.2. Amostras

Neste trabalho estudou-se as capacidades analíticas de uma língua eletrónica e do HPLC em bebidas não alcoólicas, mais precisamente em sumos comerciais de vários tipos. As bebidas foram adquiridas em superfícies comerciais da cidade de Bragança, num total de trintas amostras.

Na Tabela 4 apresentam-se as 30 amostras obtidas e analisadas neste trabalho. Faz-se a descrição do tipo de sumo comercial, a sua lista de ingredientes em sumos de fruta, bem como, a percentagem de sumo total adicionado de acordo com o referido no rótulo .

**Tabela 4 – Amostras comerciais analisadas.**

<b>Nº da amostra</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Tipo</b>	<b>Lista de ingredientes</b>	<b>% Mínima de sumo</b>
1	Continente Manga Laranja	Néctar	Parcialmente fabricado à base de sumos concentrados. Água, sumo de laranja à base de concentrado (30%), polpa de manga (15%).	45
2	Continente Multifrutos	Néctar	Parcialmente fabricado à base de sumos concentrados. Água, sumo de laranja maçã e maracujá à base de concentrado (48%), polpa de banana (2%).	50
3	Continente Laranja	Néctar	Fabricado à base de sumos concentrados. Água, sumo de laranja (50%) à base de concentrado	50
4	Continente, Morango Maçã	Néctar	Parcialmente fabricado à base de sumos concentrados. Água, sumo de maçã à base de concentrado (10%), polpa de morango e maçã (35%).	45
5	Compal Vital Néctar de laranja, cenoura e manga	Néctar	Fabricado à base de sumos concentrados. Água, sumos e polpas de limão (1%), manga (12%), cenoura (14%), laranja (23%): à base de concentrados	50
6	Compal Clássico Néctar de pessego	Néctar	Água, sumo e polpa de pêssego (50%)	50
7	Compal Light Tropical cenoura	Refrigerante	Água, sumos e polpas de manga, tomate (7%), maçã, cenoura (3%), maracujá, kiwi e limão: à base de concentrado.	25
8	Compal Clássico Néctar de manga	Néctar	Água, sumo e polpa de manga à base de concentrado.	30
9	Compal Fresh 100% sumo de maçã	Sumo	Sumo de maçã à base de concentrado.	100
10	Compal Vital Néctar de frutos vermelhos	Néctar	Proveniente de concentrado. Água, sumos de uva tinta, amora, maçã, morango, framboesa, cranberry, groselha.	40
11	Compal Fresh 100% sumo de laranja à base de concentrado	Sumo	Sumo e polpa de laranja à base de concentrado.	100
12	Compal Light Ananás/Coco	Néctar	Bebida à base de sumo de ananás com aroma de coco. Água, sumo de ananás à base de concentrado.	43
13	Compal Clássico Néctar de pêra	Néctar	Água, sumo e polpa de pêra.	50
14	Compal Vital Romã/Chá verde	Refrigerante	Bebida à base de sumos de romã e uva com chá verde. Água, sumos de uva (4%) e romã (16%) à base de concentrados.	20
15	Continente Laranja (Infantil)	Refrigerante	Água, sumos de fruta à base de concentrados de laranja (10%), maçã, ananás e manga (9%), polpa de alperce (1%).	20

**Tabela 4 (cont.) – Amostras comerciais analisadas.**

<b>Nº da amostra</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Tipo</b>	<b>Lista de ingredientes</b>	<b>% Mínima de sumo</b>
16	Continente Ananás (Infantil)	Refrigerante	Água, sumos de fruta à base de concentrados de ananás (10%), maçã e laranja (4,5%), polpa de banana (0,5%),	20
17	Continente Tropical (Infantil)	Refrigerante	Água, sumos de fruta à base de concentrados de maçã laranja ananás manga (18%), polpa de goiaba (1,5%) e polpa de banana (0,5%).	20
18	Um Bongo, Morango	Refrigerante	Água, sumos de morango (6%), maçã, laranja, ananás, maracujá, alperce, goiaba, manga, banana: à base de concentrados.	14
19	Um Bongo, 8 Frutos	Refrigerante	Água, sumos de maçã, laranja, ananás, maracujá, alperce, goiaba, manga, banana: à base de concentrados.	20
20	Um Bongo, Ananás	Refrigerante	Água, sumos de ananás (10%), maçã, laranja, maracujá, alperce, goiaba, manga, banana: à base de concentrados.	20
21	Um Bongo, Laranja	Refrigerante	Água, sumos de laranja (10%), maçã, ananás, maracujá, alperce, goiaba, manga, banana: à base de concentrados.	20
22	Sumol, Laranja	Refrigerante	Água gaseificada, sumo e polpa de laranja (10%).	10
23	Sumol, Ananás	Refrigerante	Água gaseificada, sumo e polpa de ananás (8%)	8
24	Frisumo, Laranja	Refrigerante	Água gaseificada e sumo concentrado de laranja (8%).	8
25	Fresky, Laranja	Refrigerante	Água, sumo de laranja à base de concentrado (11%).	11
26	Frisumo, Ananás	Refrigerante	Água gaseificada e sumo concentrado de ananás (6%).	6
27	Fresky, Frutos tropicais	Refrigerante	Água, sumo de frutos de frutos tropicais à base de concentrado (12%).	12
28	Compal light Tropical cenoura	Néctar	Água, sumos e polpas de manga, tomate, maçã, cenoura (3%), maracujá, kiwi e limão: à base de concentrados.	32
29	Compal Fresh Néctar de maracujá	Néctar	Proveniente de concentrado. Água, sumo e polpa de maracujá à base de concentrado.	25
30	Compal Light Morango e maçã	Néctar	Parcialmente fabricado à base de sumos concentrados. Água, sumo e polpa de morango (26%), polpa de maçã (10%), sumo de maçã (9%): à base de concentrado.	45

Verifica-se que as amostras usadas neste trabalho são 6,7% de sumos, 43,3% de néctares e 50% de refrigerantes.

Os sumos analisados são maioritariamente produzidos usando sumo de laranja, seguindo-se o sumo de maçã, manga, ananás, maracujá e banana.

Alguns dos sumos mostram na sua composição a presença de extratos de chás ou sumos de frutos que aparecem raramente: Chá verde, romã, coco, pêra, pêsego, framboesa, groselha, amora e arando.

Os sumos 100% são preparados por diluição de sumos concentrados, os néctares são preparados com níveis, em geral, de 25% até 50% de sumos de frutos concentrados, e os refrigerantes de 6% até 25% de sumos concentrados. Estes dados encontram-se de acordo com as disposições legais impostas [2, 3].

### **3.3. Preparação de soluções**

Para a calibração do HPLC preparou-se várias soluções padrão de mistura de todos os padrões: sacarose, frutose, glucose, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido láctico e ácido acético. Estas soluções foram obtidas por medição de massas de cada composto para balões volumétricos de forma a obterem-se concentrações a variar entre 0,128 e 8,34 g/L. No estudo da precisão e exatidão preparou-se soluções de controlo de qualidade usando o mesmo procedimento para os compostos acima referidos (exceto para o ácido tartárico e ácido láctico por se ter verificado que não estavam presentes nas amostras analisadas).

### **3.4. Análises com HPLC**

As amostras foram analisadas num sistema de cromatografia constituído por um HPLC Varian, equipado com uma bomba Prostar 220, um injetor manual Rheodyne modelo 7725i, provido com um loop de 20  $\mu$ L, um forno Jones CHromatography modelo 7981 e uma coluna Supelcogel C-610H com 30 cm  $\times$  7,8 mm ID de dimensão. Na análise cromatográfica foram usados dois detetores: o detetor IR da Varian modelo RI-4 para a análise e quantificação dos açúcares (sacarose, glucose e frutose) e o detetor UV da Varian modelo

9050 (comprimento de onda ajustado a 210 nm e à temperatura de 45 °C), para a análise e quantificação dos ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido láctico e ácido acético).

As trinta amostras foram filtradas com o auxílio de microfiltros (nylon 0,2 µm da Whatman) e seringas para dentro de vials, depois foram injetadas duas vezes no HPLC. Na quantificação dos açúcares repetiu-se o mesmo processo mas com a diferença de que as amostras foram diluídas em ácido orto-fosfórico a 0,1% de 1:10 pois, sem diluição os picos dos açúcares apareciam saturados. Cada vez que era injetada uma amostra, era necessário aguardar 30 minutos, para dar tempo a todos os compostos de serem analisados pela coluna, antes de passar a seguinte amostra.

As amostras que continham gás foram des-gaseificadas no ultrassons da Elma Transsonic 460/H durante aproximadamente 5 minutos, antes de serem utilizadas.

Quando as amostras não estavam a ser utilizadas, permaneciam no congelador.

Os dados foram recolhidos, registados e tratados através do software Star Chromatography Workstation, version 6.4.

O eluente utilizado no HPLC para a análise de açúcares e ácidos orgânicos foi o ácido orto-fosfórico a 0,1%, da Fisher Scientific. Todos os eluentes preparados para o HPLC foram antecipadamente filtrados com um sistema de filtração da Phenomenex com um filtro de Nylon 0,2 µm, juntamente com uma bomba de vácuo da Laboport.

### **3.5. Análises com os sensores**

A língua eletrónica utilizada neste trabalho é constituída por dois sistemas de multi-sensores e um eléctrodo de referência Ag/AgCl. No primeiro sistema, as membranas eram selectivas a iões preparadas por mistura de um aditivo do respetivo ião (5,0%) com o plastificante 2-NPOE (62,1%) e o polímero PVC (33,0%). No segundo sistema, membranas de sensibilidade cruzada, as membranas foram preparadas com vários compostos lipídicos (3,0%), o plastificante Dibutil-Sebacato (65,0%) e o polímero PVC (32,0%). Cada membrana foi colocada em duplicado no sistema de multi-sensores.

Na Tabela 5, estão representados mais em promenor os constituintes dos sensores, bem como, a indicação da numeração indicada a cada membrana.

**Tabela 5 - Informação relativa aos sensores usados.**

<b>Nº do sensor</b>	<b>Aditivo seletivo a ião</b>	<b>Nº do sensor</b>	<b>Aditivo de sensibilidade cruzada</b>
S1-S2	Magnésio	S21-S22	Ácido oleico
S3-S4	Cálcio	S23-S24	Brometo de Tetradecilamónio (TDA)
S5-S6	Sódio	S25-S26	Álcool oleílico
S7-S8	Potássio	S27-S28	Fosfato de Bis (2-etil-hexilo) (T2EHP)
S9-S10	Sulfato	S29-S30	Octadecilamina
S11-S12	Cloreto	S31-S32	1-Octadecanotiol
S13-S14	Nitrato	S33-S34	Dibenzo-18-crown-6
S15-S16	Amónio	S35-S36	TDA + T2EHP (1:1)
S17-S18	Hidrogénio	S37-S38	TDA + Ácido oleílico (1:1)
S19-S20	AgCl	S39-S40	Ácido oleico

No segundo sistema, as membranas contendo ácido oleico foram colocados em quadruplicado.

As análises com os sensores foram efetuadas de forma direta, ou seja, a língua eletrónica era colocada diretamente em cada sumo (sem diluições) durante 10 minutos. Cada sumo foi analisado duas vezes. Os sinais dos sensores foram adquiridos através do software “Agilent BenchLink Data Logger”. Os sinais dos sensores foram importados para o Excel que permitiu a visualização do sinal em função do tempo e sua preparação para o tratamento de dados com o SPSS, programa de estatística. Todos os sumos foram analisados a 25°C numa célula de vidro de dupla parede termostalizada, colocada sobre um agitador magnético da marca Velp Scientifica, para agitar a amostra durante a análise.

Os resultados e conclusões obtidas dos dados experimentais resultantes quer da aplicação do HPLC quer da aplicação da língua eletrónica estão a seguir apresentados.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Análise por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho usando os detetores IR e UV**

No decorrer do trabalho experimental pretendeu-se otimizar uma técnica analítica (HPLC) com vista à sua aplicação no controlo de qualidade de bebidas comerciais, nomeadamente de sumos comerciais sem álcool.

O desenvolvimento desta técnica visou a sua utilização na separação de três açúcares (sacarose, glucose e frutose) e seis ácidos (ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido acético). Assim, seguidamente indicam-se os resultados obtidos durante:

- A identificação dos picos do cromatograma;
- A calibração do sistema de HPLC com soluções padrão de calibração preparadas por mistura de compostos;
- A validação do método de HPLC usando soluções de controlo de qualidade;
- A validação do método de HPLC usando uma amostra;
- A análise de amostras de sumos por HPLC.

#### **4.1.1. Calibração do sistema de HPLC**

Como já foi referido, no controlo de qualidade de bebidas comerciais é importante monitorizar a concentração de diferentes compostos, nomeadamente, açúcares e ácidos orgânicos. A Figura 3 mostra um exemplo de cromatograma obtido no estudo da capacidade da coluna Supelcogel C-610H (30 cm × 7,8 mm ID de dimensão) em analisar vários compostos presentes em bebidas comerciais, usando os detetores de UV (a 210 nm) e IR. O cromatograma foi obtido da análise de uma solução preparada por mistura de vários compostos: sacarose, glucose, frutose, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido acético, glicerol e etanol.

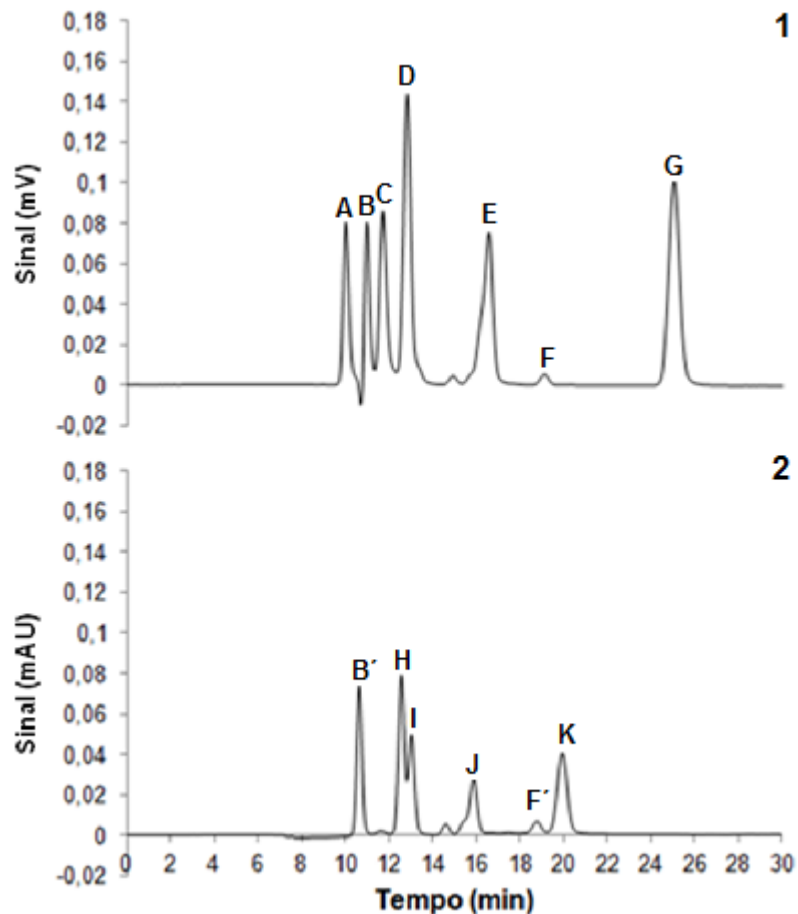


Figura 3 – Exemplos de cromatogramas de HPLC obtidos para uma solução padrão de calibração com o detector IR (1) e detector UV (2): Sacarose (A), Ácido cítrico (B), Glucose (C), Frutose (D), Glicerol (E), Ácido acético (F), Etanol (G), Ácido cítrico (B'), Ácido málico (H), Ácido ascórbico (I), Ácido láctico (J), Ácido acético (F') e Pico desconhecido (K).

O primeiro objetivo deste trabalho foi caracterizar as diferentes amostras de sumos ao nível da sua composição em açúcares e ácidos orgânicos. Verificou-se que os compostos presentes nas amostras de sumos deste trabalho são: sacarose, glucose, frutose, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico e ácido acético

A análise destes compostos, por HPLC, foi efetuada através de curvas de calibração obtidas usando cinco soluções padrão preparadas por mistura dos referidos compostos com diferentes concentrações.

Na Tabela 6 indicam-se os níveis de concentrações usadas para cada composto nas soluções padrão de calibração do HPLC que, em geral, encontravam-se entre 0,1 e 8,4 g/L.

**Tabela 6 – Intervalo de concentrações das soluções padrão utilizadas na obtenção das curvas de calibração para o HPLC.**

<b>Compostos</b>	<b>Concentrações (g/L)</b>
Glucose	[0,321 - 5,03]
Frutose	[0,348 - 5,13]
Sacarose	[0,326 - 5,02]
Ácido Cítrico	[0,390 - 4,62]
Ácido Tartárico	[0,691 - 8,34]
Ácido Málico	[0,382 - 5,00]
Ácido Ascórbico	[0,233 - 1,02]
Ácido Acético	[0,128 - 1,10]

Em virtude de se pretender dispor de um sistema de HPLC que pudesse ser utilizado na análise de outras bebidas que não sumos, nomeadamente vinho, as soluções padrão contêm elevadas concentrações de ácido tartárico e baixas concentrações de ácido acético.

A informação relativa aos tempos de retenção obtidos para cada um dos compostos presentes nas soluções padrão e amostras, bem como, os parâmetros da curva de calibração apresentam-se a seguir.

Na Tabela 7 apresentam-se os tempos de retenção médios globais para as amostras e padrões, bem como, os respetivos valores dos desvios padrão.

**Tabela 7 – Tempos médios de retenção obtidos na análise de amostras e soluções padrão para o sistema de HPLC.**

	<b>Compostos</b>	<b>Tempo de retenção das amostras (min)</b>		<b>Tempo de retenção dos padrões (min)</b>	
		<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão (s)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão (s)</b>
<b>Detetor IR</b>	Sacarose	10,01	0,02	9,99	0,01
	Glucose	11,69	0,02	11,679	0,005
	Frutose	12,74	0,02	12,723	0,005
<b>Detetor UV (210 nm)</b>	Ácido Cítrico	10,67	0,02	10,64	0,02
	Ácido Tartárico	11,26	0,03	11,33	0,04
	Ácido Málico	12,57	0,03	12,58	0,02
	Ácido Ascórbico	13,04	0,04	13,03	0,01
	Ácido Acético	18,81	0,03	18,79	0,01

Com base nos tempos de retenção médios obtidos pode afirmar-se que, com um nível de significância de 5% (teste t-student) não existem evidências

estatísticas que permitam afirmar que existem diferenças entre os tempos de retenção registados nas amostras e nas soluções padrão, exceto para a sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico. Porém convém salientar que as médias dos tempos de retenção das amostras e dos padrões são muito semelhantes, podendo atribuir-se a diferença significativa entre os resultados ao facto da variabilidade nas soluções padrão ser bastante inferior às das amostras. O desvio padrão dos tempos de retenção das amostras e dos padrões variaram entre 0,02-0,04 e 0,005-0,04 minutos, respetivamente. Verificou-se ainda que no detetor IR, as variações nos tempos de retenção das amostras e padrões são globalmente dos mais baixos comparativamente aos resultados obtidos com o detetor UV. Por fim, os resultados mostram que a análise por HPLC, quer nos padrões quer nas amostras, para ambos os detetores é bastante reprodutível.

A curva de calibração para cada composto analisado no sistema de HPLC foi determinada pela relação entre as áreas dos picos de cada composto em função das respetivas concentrações.

Na Figura 4 está representado, como exemplo típico de calibração por HPLC, a reta de calibração obtida da relação linear entre as áreas dos picos da glucose e as respetivas concentrações usadas nas soluções padrão, assim como o valor de coeficiente de correlação. A mesma informação foi obtida nas calibrações referentes aos outros compostos analisados.

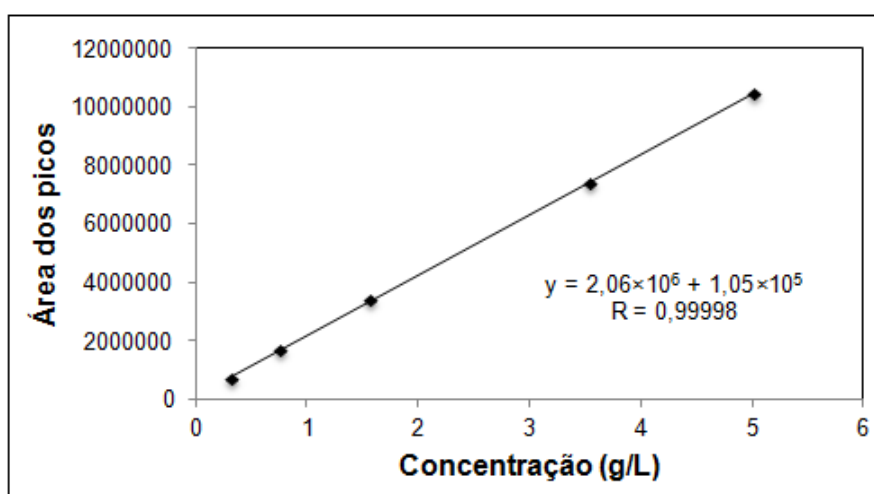


Figura 4 – Gráfico de calibração obtido para a glucose por HPLC.

Na Tabela 8 mostram-se os parâmetros da calibração obtidos por regressão linear para cada composto no HPLC.

**Tabela 8 – Parâmetros obtidos da calibração por regressão linear.**

	<b>Compostos</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>R</b>	<b>LD (g/L)</b>	<b>LQ (g/L)</b>
<b>Detetor IR</b>	Glucose	$2,06 \times 10^6$	$1,05 \times 10^5$	0,99998	0,03	0,10
	Frutose	$1,95 \times 10^6$	$-1,76 \times 10^4$	0,99999	0,02	0,06
	Sacarose	$1,68 \times 10^6$	$6,29 \times 10^3$	0,999997	0,01	0,04
<b>Detetor UV</b>	Ácido Cítrico	$1,05 \times 10^6$	$-6,95 \times 10^4$	0,99993	0,06	0,17
	Ácido Tartárico	$1,34 \times 10^6$	$8,84 \times 10^4$	0,99993	0,11	0,32
	Ácido Málico	$7,51 \times 10^5$	$2,15 \times 10^4$	0,99995	0,06	0,17
	Ácido Ascórbico	$2,90 \times 10^6$	$-3,74 \times 10^5$	0,99955	0,04	0,11
	Ácido Acético	$4,99 \times 10^5$	$-2,18 \times 10^3$	0,99987	0,02	0,06

a – Declive (contagem×L/g); b – Ordenada na origem; R – Coeficiente de correlação; LD – Limite de detecção; LQ – limite de quantificação

Por ordem decrescente, o ácido ascórbico foi o composto que mostrou maior sensibilidade ( $\approx 2,9 \times 10^6$  contagem×L/g), seguido da glucose e frutose com sensibilidades próximas ( $\approx 2,0 \times 10^6$  contagem×L/g); a sacarose obteve um valor de  $1,68 \times 10^6$  contagem×L/g, ligeiramente mais baixo que os dos monossacarídeos. O ácido málico e ácido acético foram os compostos com menores sensibilidades, com valores iguais a  $7,51 \times 10^5$  e  $4,99 \times 10^5$  contagem×L/g, respetivamente. Os declives obtidos neste trabalho são, de modo geral, maiores do que os declives obtidos por Vérette *et al*, Pérez-Ruiz *et al*, Eyéghé-Bickong *et al* e Shui and Leong [55-58].

Todas as retas de calibração apresentaram coeficientes de correlação bons ( $R \geq 0,999$ ), semelhantes aos reportados por Vérette *et al* (1995) (referente aos açúcares e aos ácidos cítrico, tartárico, málico e acético) e Pérez-Ruiz *et al* (2004) (referente ao ácido cítrico, tartárico e málico) [55, 56].

Os LD variaram entre 0,01 e 0,11 g/L. Os valores de LD mais baixos foram obtidos para a sacarose, frutose, ácido acético e glucose com valores a variar entre 0,01 e 0,03 g/L. Os valores de LD mais altos foram obtidos para o ácido tartárico e ácido cítrico e málico, com valores iguais a 0,11 e 0,06 g/L, respetivamente. Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por Eyéghé-Bickong *et al* para a glucose, frutose e ácidos cítrico, málico e tartárico

(cujos valores variavam entre 0,02 e 0,16 g/L) e são da mesma ordem de grandeza dos determinados por Vérette *et al* para a glucose, frutose e para os ácidos cítrico, tartárico, málico e acético (entre 0,04 e 0,11g/L) [55, 57]. Shui and Leong (com valores entre 0,0002 e 0,01 g/L) apresentaram valores inferiores aos determinados neste estudo, assim como os valores descritos por Scherer *et al* para o ácido cítrico, tartárico, ascórbico e málico [58, 59].

Os valores de LQ variaram entre 0,04 e 0,32 g/L. Os resultados mais elevados estão associados mais uma vez ao ácido tartárico (0,32 g/L) e ácido cítrico e málico (0,17 g/L). A sacarose, frutose e ácido acético apresentam os menores valores de LQ ( $\leq 0,06$  g/L). Os resultados obtidos no presente trabalho são muito superiores aos referidos por Scherer *et al* para o ácido cítrico, tartárico, ascórbico e málico. Rodrigues *et al* apresentaram valores inferiores para o ácido cítrico e málico (0,07; 0,001 g/L, respetivamente), e superiores para o ácido acético (0,115 g/L), relativamente aos obtidos neste trabalho [59, 60].

Na deteção por IR, os picos da glucose e frutose são afetados pelos picos do ácido tartárico e ácido málico, respetivamente, em virtude destes compostos terem tempos de retenção muito semelhantes (Tabela 7) e serem moléculas com rotatividade ótica (e por isso detetados pelo IR). A resolução desta interferência foi possível considerando a concentração do respetivo ácido calculada pelo cromatograma obtido com o detetor UV e efetuando a sua correção nos dados obtidos pelo detetor IR. Na quantificação da concentração de glucose nas amostras não foi necessário proceder a esta correção, pois as quantidades de ácido tartárico nos sumos analisados eram muito baixas, inferiores ao limite de deteção ( $< 0,11$  g/L).

Na Tabela 9 indica-se a equação de calibração estabelecida para calcular a concentração de frutose, tendo em consideração a correção da presença de ácido málico e para determinar a concentração de glucose, tendo em consideração a correção da presença de ácido tartárico. Estas duas situações particulares de interferência já foram referidas por Eyéghé-Bickong *et al* [57].

**Tabela 9 – Equação de calibração referente à presença simultânea de frutose/ácido málico.**

<b>Composto</b>	<b>Equação da reta</b>	<b>R</b>
<b>Frutose</b>	Área do pico= [Frutose] $\times 1,93 \times 10^6 + 5,73 \times 10^4 +$ [Ácido Málico] $\times 1,44 \times 10^6$	0,9999
<b>Glucose</b>	Área do pico = [Glucose] $\times 2,06 \times 10^6 + 1,22 \times 10^5 +$ [Ácido Tartárico] $\times 2,07 \times 10^6$	0,9999

#### **4.1.2. Validação do método de HPLC**

Qualquer método analítico necessita de mostrar a sua fiabilidade através da avaliação de parâmetros de desempenho, que globalmente se define como validação.

A validação do método de HPLC foi efetuada tendo em conta o estudo da:

- a)** Precisão (repetibilidade e precisão intermédia) com base na análise cromatográfica de uma solução padrão de controlo de qualidade e exatidão usando várias soluções padrão de controlo de qualidade;
- b)** Precisão (repetibilidade e precisão intermédia) com base na análise cromatográfica de uma amostra (amostra 2);

As soluções de controlo de qualidade foram preparadas por mistura dos compostos identificados nas amostras de sumos analisados neste trabalho: sacarose, glucose, frutose, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico e ácido acético.

A amostra 2 corresponde a um néctar produzido à base de sumos concentrados, com um teor mínimo de sumo de 50% (Tabela 4).

Na Tabela 10 apresentam-se os valores dos coeficientes de variação percentuais no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para uma solução de controlo de qualidade ao nível dos tempos de retenção e das concentrações obtidas por HPLC.

**Tabela 10 – Repetibilidade e precisão intermédia da análise da solução de controlo de qualidade por HPLC.**

Composto	Tempo de retenção			Concentrações		
	Média (min.)	S (min.)	sr%	Média (g/L)	S (g/L)	sr%
	<b>Repetibilidade (IR)</b>					
Sacarose	9,99	0,02	0,2	0,798	0,005	0,7
Glucose	11,66	0,02	0,2	0,749	0,009	1
Frutose	12,78	0,02	0,1	0,813	0,005	0,6
	<b>Repetibilidade (UV)</b>					
Ácido Cítrico	10,64	0,01	0,1	0,685	0,001	0,2
Ácido Málico	12,57	0,01	0,1	0,828	0,006	0,7
Ácido Ascórbico	13,02	0,01	0,1	0,227	0,007	3
Ácido Acético	18,76	0,02	0,08	0,045	0,002	4
	<b>Precisão intermédia (IR)</b>					
Sacarose	9,97	0,03	0,3	0,809	0,01	2
Glucose	11,64	0,03	0,2	0,76	0,02	2
Frutose	12,76	0,02	0,2	0,81	0,01	2
	<b>Precisão intermédia (UV)</b>					
Ácido Cítrico	10,64	0,01	0,1	0,681	0,003	0,5
Ácido Málico	12,57	0,01	0,1	0,827	0,005	0,7
Ácido Ascórbico	13,02	0,01	0,1	0,21	0,02	8
Ácido Acético	18,76	0,02	0,08	0,043	0,003	7

s – Desvio padrão; sr% - Desvio padrão relativo percentual

Os tempos de retenção da solução de controlo de qualidade obtidos para cada composto, no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia no detetor IR e UV são muito semelhantes, mostrando valores de desvio padrão relativo percentual baixos ( $sr\% \leq 0,3\%$ ), tal como o esperado.

Globalmente pode afirmar-se que, no estudo da repetibilidade e precisão intermédia dos valores das concentrações, os resultados obtidos são aceitáveis ( $sr\% \leq 5\%$ ) exceto, na análise de ácido ascórbico e acético (na precisão intermédia) devido a um valor de desvio padrão relativo percentual maior do que o esperado e devido ao baixo valor de concentração, respetivamente.

A exatidão do método foi avaliada através do cálculo do erro relativo percentual associado às concentrações obtidas a partir das curvas de calibração anteriormente estabelecidas para a solução de controlo de qualidade (de concentrações conhecidas) usada no estudo da precisão.

Na Tabela 11 mostram-se os resultados do estudo da exatidão, ou seja, o erro relativo percentual das concentrações médias obtidas do estudo da precisão intermédia usando a solução de controlo de qualidade.

**Tabela 11 – Estudo da exatidão da análise da solução de controlo de qualidade por HPLC.**

<b>Compostos</b>	<b>Valor exato g/L</b>	<b>Er% Precisão intermédia</b>
Glucose	0,804	5
Frutose	0,773	5
Sacarose	0,814	0,6
Ácido Cítrico	0,695	2
Ácido Málico	1,042	21
Ácido Ascórbico	0,221	4
Ácido Acético	0,159	73

Er% – Erro relativo percentual.

A sacarose, ácido cítrico, ácido ascórbico, glucose e frutose apresentaram os valores mais aceitáveis de erro relativo percentual ( $\leq 5\%$ ). O ácido málico e acético foram os compostos que apresentaram os piores resultados, o que leva a concluir que se deve analisar as soluções de controlo de qualidade logo após a sua preparação. Apesar dos resultados para o ácido ascórbico terem sido aceitáveis deve-se ter especial atenção a este composto pois é facilmente oxidável. Estes resultados mostram que este trabalho deveria ter sido repetido usando outra ou várias soluções de controlo de qualidade.

Embora os valores de exatidão obtidos com a solução de controlo de qualidade usada no estudo da precisão não terem sido os melhores para alguns dos compostos, em geral, o método mostra ser aceitável ( $Er\% \leq 5\%$ ).

Para verificar se esta situação era pontual efetuou-se a análise de três novas soluções de controlo de qualidade e os resultados para o erro relativo percentual estão apresentados na Tabela 12. Os erros relativos percentuais destas três soluções de controlo de qualidade são inferiores a 5%, exceto em quatro casos para três compostos. Estes resultados mostram que é necessário um maior controlo na preparação das soluções para evitar estes erros elevados.

**Tabela 12 – Estudo da exatidão para três soluções de controlo de qualidade.**

<b>Compostos</b>	<b>Glucose</b>	<b>Frutose</b>	<b>Sacarose</b>	<b>Ácido Cítrico</b>	<b>Ácido Málico</b>	<b>Ácido Ascórbico</b>	<b>Ácido Acético</b>
<b>Er%</b>	0,2 7 8	1 3 15	0,1 1 2	0,3 2 3	0,3 0,7 2	0,7 4 7	0,2 3 4

Na Tabela 13 apresentam-se os resultados obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para uma amostra. Os valores de concentração obtidos no detetor IR, são apresentados tendo em conta o fator de diluição.

**Tabela 13 – Repetibilidade e precisão intermédia das análises efetuadas à amostra 2 por HPLC.**

Composto	Tempo de retenção			Concentrações		
	Média (min.)	s	sr%	Média (g/L)	s	sr%
	<b>Repetibilidade (IR)</b>					
Sacarose	9,98	0,01	0,07	0,91	0,01	1
Glucose	11,66	0,01	0,06	1,142	0,004	0,3
Frutose	12,71	0,01	0,06	2,16	0,01	0,5
	<b>Repetibilidade (UV)</b>					
Ácido Cítrico	10,66	0,01	0,07	2,54	0,01	0,4
Ácido Málico	12,55	0,01	0,07	2,55	0,04	2
Ácido Ascórbico	13,03	0,01	0,06	0,409	0,007	2
Ácido Acético	18,80	0,01	0,04	D	-	-
	<b>Precisão intermédia (IR)</b>					
Sacarose	9,99	0,01	0,1	0,904	0,006	0,6
Glucose	11,66	0,01	0,09	1,10	0,02	2
Frutose	12,72	0,01	0,1	2,09	0,05	2
	<b>Precisão intermédia (UV)</b>					
Ácido Cítrico	10,64	0,01	0,1	2,536	0,006	0,2
Ácido Málico	12,53	0,01	0,1	2,47	0,07	3
Ácido Ascórbico	13,03	0,01	0,05	0,41	0,01	4
Ácido Acético	18,79	0,01	0,04	D	-	-

s – Desvio padrão; sr% - Desvio padrão relativo percentual; D - Detetado

A amostra 2 apresenta, por ordem decrescente, valores de concentração elevados de frutose, glucose e sacarose. Em relação aos ácidos orgânicos, o ácido cítrico e ácido málico têm concentrações semelhantes ( $\approx 2,5$  g/L) sendo o ácido ascórbico, o terceiro ácido orgânico mais concentrado. O ácido acético foi detetado nesta amostra, mas não foi possível quantificar por se encontrar abaixo do limite de quantificação. Globalmente, os resultados são aceitáveis ( $sr\% \leq 5\%$ ) quer para os tempos de retenção quer para as concentrações dos compostos analisados, ao nível da repetibilidade e precisão intermédia.

Comparando os tempos de retenção obtidos para cada um dos compostos, no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia, verifica-se que são muito semelhantes, não havendo diferenças significativas a um nível de significância de 5% (teste t-student).

As concentrações obtidas no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia são muito semelhantes embora, com valores de desvio padrão tão baixos em alguns casos que estatisticamente poderiam ser considerados diferentes.

#### **4.1.3. Análise das amostras**

Por HPLC, analisaram-se trinta amostras de bebidas comerciais à base de sumo nomeadamente, dois sumos, treze néctares e quinze refrigerantes. As amostras foram analisadas diretamente para detetar/quantificar os ácidos orgânicos por UV, e após diluição, para quantificar os açúcares por IR.

Na Tabela 14 apresentam-se as concentrações finais obtidas para os compostos analisados nas amostras por HPLC.

Os açúcares analisados estão presentes em todas as amostras de sumos. Os níveis de sacarose nos sumos variam entre 1,49 g/L (amostra A4) a 76,8 g/L (amostra A29). Só em duas amostras (amostras 10 e 14) os níveis são abaixo do limite de quantificação.

As concentrações de glucose nas amostras variaram entre 10,0 g/L (amostras A4 e A30) e 57,5 g/L (amostra A26).

Em relação à frutose, os valores de concentração encontram-se entre 13,1 g/L (amostra A26) e 84,3 g/L (amostra A28). As amostras da A2 à A7, A9, A10 e A12 sofreram uma correção para corrigir a interferência do ácido málico.

Para alguns dos compostos analisados obtiveram-se, em certas amostras, valores de concentração fora do intervalo de concentrações definido para os padrões da reta de calibração, estando esta situação indicada na Tabela com a letra “E1” e “E2” de extrapolações: “E1” representa as situações onde as concentrações são superiores ao LQ e inferiores à concentração do primeiro padrão da reta de calibração; “E2” corresponde às concentrações superiores à concentração do último padrão da reta de calibração. Na sacarose observou-se esta situação em nove amostras (duas situações “E1” e sete situações “E2”),

**Tabela 14 – Concentrações finais (g/L) dos compostos presentes nas amostras analisadas por HPLC.**

Amostras	Sacarose	Glucose	Frutose	Ácido Cítrico	Ácido Málico	Ácido Ascórbico	Ácido Acético
1	14,2	11,3	16,1	4,96 <sup>E2</sup>	ND	0,202 <sup>E1</sup>	D
2	9,69	11,6	22,6*	2,20	2,04	0,235	D
3	13,0	12,9	15,0*	5,41 <sup>E2</sup>	1,08	0,144 <sup>E1</sup>	ND
4	1,49 <sup>E1</sup>	10,0	19,0*	2,76	2,31	0,140 <sup>E1</sup>	D
5	14,7	13,0	20,5*	3,55	1,79	0,136 <sup>E1</sup>	ND
6	74,0 <sup>E2</sup>	17,8	16,2*	1,39	2,43	0,197 <sup>E1</sup>	ND
7	11,6	32,0	56,3* <sup>E2</sup>	2,07	0,342 <sup>E1</sup>	0,138 <sup>E1</sup>	ND
8	60,3 <sup>E2</sup>	19,2	25,9	2,62	ND	0,275	ND
9	13,0	29,7	69,3* <sup>E2</sup>	1,19	4,70	0,150 <sup>E1</sup>	ND
10	D	14,4	16,5*	2,94	1,06	0,217 <sup>E1</sup>	ND
11	35,0	25,0	30,2	7,85 <sup>E2</sup>	ND	0,374	D
12	15,9	16,9	16,7*	2,02	1,43	0,145 <sup>E1</sup>	ND
13	47,5	11,7	26,5	1,22	ND	0,144 <sup>E1</sup>	ND
14	D	11,8	13,6	3,44	ND	0,214 <sup>E1</sup>	ND
15	57,0 <sup>E2</sup>	24,2	27,8	3,23	ND	0,189 <sup>E1</sup>	ND
16	72,4 <sup>E2</sup>	19,5	22,1	3,17	ND	0,212 <sup>E1</sup>	D
17	42,0	32,4	38,6	3,26	ND	0,184 <sup>E1</sup>	ND
18	35,0	28,6	31,7	2,45	ND	ND	ND
19	42,4	28,1	33,6	3,65	ND	0,141 <sup>E1</sup>	ND
20	67,0 <sup>E2</sup>	20,4	23,1	2,20	ND	0,169 <sup>E1</sup>	ND
21	68,5 <sup>E2</sup>	17,9	21,5	3,74	ND	0,180 <sup>E1</sup>	ND
22	32,7	32,4	23,1	1,74	ND	0,157 <sup>E1</sup>	ND
23	38,4	36,0	30,4	1,27	ND	0,147 <sup>E1</sup>	ND
24	30,5	42,7	28,5	1,88	ND	0,135 <sup>E1</sup>	ND
25	25,2	11,5	13,1	2,61	ND	0,152 <sup>E1</sup>	ND
26	9,73	57,5 <sup>E2</sup>	44,5	1,81	ND	ND	ND
27	19,3	22,2	27,1	3,65	ND	0,163 <sup>E1</sup>	ND
28	31,6	54,1 <sup>E2</sup>	84,3 <sup>E2</sup>	3,71	ND	0,201 <sup>E1</sup>	D
29	76,8 <sup>E2</sup>	26,1	29,1	7,35 <sup>E2</sup>	ND	0,205 <sup>E1</sup>	ND
30	2,45 <sup>E1</sup>	10,0	17,2	1,67	ND	0,159 <sup>E1</sup>	D

\* Concentração com correção da interferência do ácido málico; E1 - Extrapolação por cálculo de uma concentração superior ao LQ e inferior à concentração do primeiro padrão da reta de calibração; E2 - Extrapolação por cálculo de uma concentração superior à concentração do último padrão da reta de calibração; ND - Inferior ao limite de detecção; D – Detetado, mas inferior ao limite de quantificação

na glucose em duas amostras (situações “E2”), na frutose em três amostras (situações “E2”), no ácido cítrico em quatro (situações “E2”) e no ácido málico em uma (situação “E1”) e no ácido ascórbico em vinte e cinco amostras (situações “E1”).

Os resultados da análise dos sumos por HPLC mostram que o ácido cítrico está presente em todos os sumos, mesmo nos três sumos, cujos rótulos não apresentavam esta informação (amostras A9, A10 e A29). Os níveis de ácido cítrico nos sumos variam entre 1,19 g/L (amostra A9) e 7,85 g/L (amostra A11). Esta grande variabilidade de concentrações de ácido cítrico nos sumos deve-se à sua função, isto é, em geral permite melhorar as propriedades organoléticas, acidificar e aumentar o tempo de conservação do produto.

Neste trabalho, a quantificação do ácido málico por UV apresentou algumas dificuldades pois na maioria das amostras os cromatogramas apresentaram um pico de um composto desconhecido com tempo de retenção próximo do pico do ácido málico. A sua deteção e posterior quantificação nos sumos só foi efetuada quando o pico apresentava tempos de retenção de  $12,57 \pm 0,03$  min. Atendendo aos resultados da precisão intermédia e repetibilidade globais obtidos para a amostra, o critério é aceitável. Por isso, embora se suspeite que o ácido málico esteja presente na maior parte dos sumos comerciais analisados, só se apresentam os resultados em nove amostras, com concentrações a variar entre 0,342 g/L (amostra A7) e 4,70 g/L (amostra A9). Uma solução para resolver este problema em trabalhos futuros será efetuar a adição de padrão de ácido málico às amostras duvidosas para verificar a sua influência no pico desconhecido.

O ácido ascórbico foi detetado em todos os sumos exceto em duas amostras (amostras A18 e A26), apesar da informação relativa à sua presença estar em todos os rótulos. Os níveis de ácido ascórbico nos sumos foram de 0,135 g/L (amostra A24) a 0,374 g/L (amostra A11). Este composto tem propriedades nutricionais (vitamina C) e antioxidantes, daí a sua presença nos sumos.

O ácido acético foi detetado só em sete sumos, mas com concentrações inferiores ao limite de quantificação. A presença deste composto pode resultar de contaminações, dado que o ácido acético consiste num dos subprodutos metabólicos resultantes de deteriorações (amostras A1, A2, A4, A11, A16, A28 e A30).

Relativamente ao ácido tartárico e ao ácido láctico, não foram detetados em nenhum dos sumos.

A sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico correspondem aos compostos maioritários ao nível da concentração e estão presentes em todas as amostras.

Na figura 5 mostram-se as representações gráficas das suas concentrações para todas as amostras, de forma a se poder visualizar as diferenças entre as amostras.

Relativamente à sacarose verifica-se que 23,3% das amostras apresentam uma concentração superior a 50g/L, 36,7% têm uma concentração inferior a 20g/L e 33,3%, concentração entre esses dois limites. De referir que nas amostras A10 e A14, a sacarose foi detetada mas não quantificada.

Em relação à glucose, podemos observar que 6,7% das amostras apresentam uma concentração superior a 50g/L, 43,3% uma concentração entre 20 e 50 g/L e 50% têm uma concentração inferior a 20g/L.

Na frutose verifica-se que 30% das amostras têm uma concentração inferior a 20g/L, 10% com concentração superior a 50g/L e as restantes 60% de amostras com concentração entre 20 e 50 g/L.

Relativamente ao ácido cítrico, com concentrações bastante inferiores aos açúcares, 10% das amostras apresentam concentração superior a 5g/L, 60% das amostras com uma concentração entre 2 e 5 g/L e 30% têm uma concentração inferior a 2g/L.

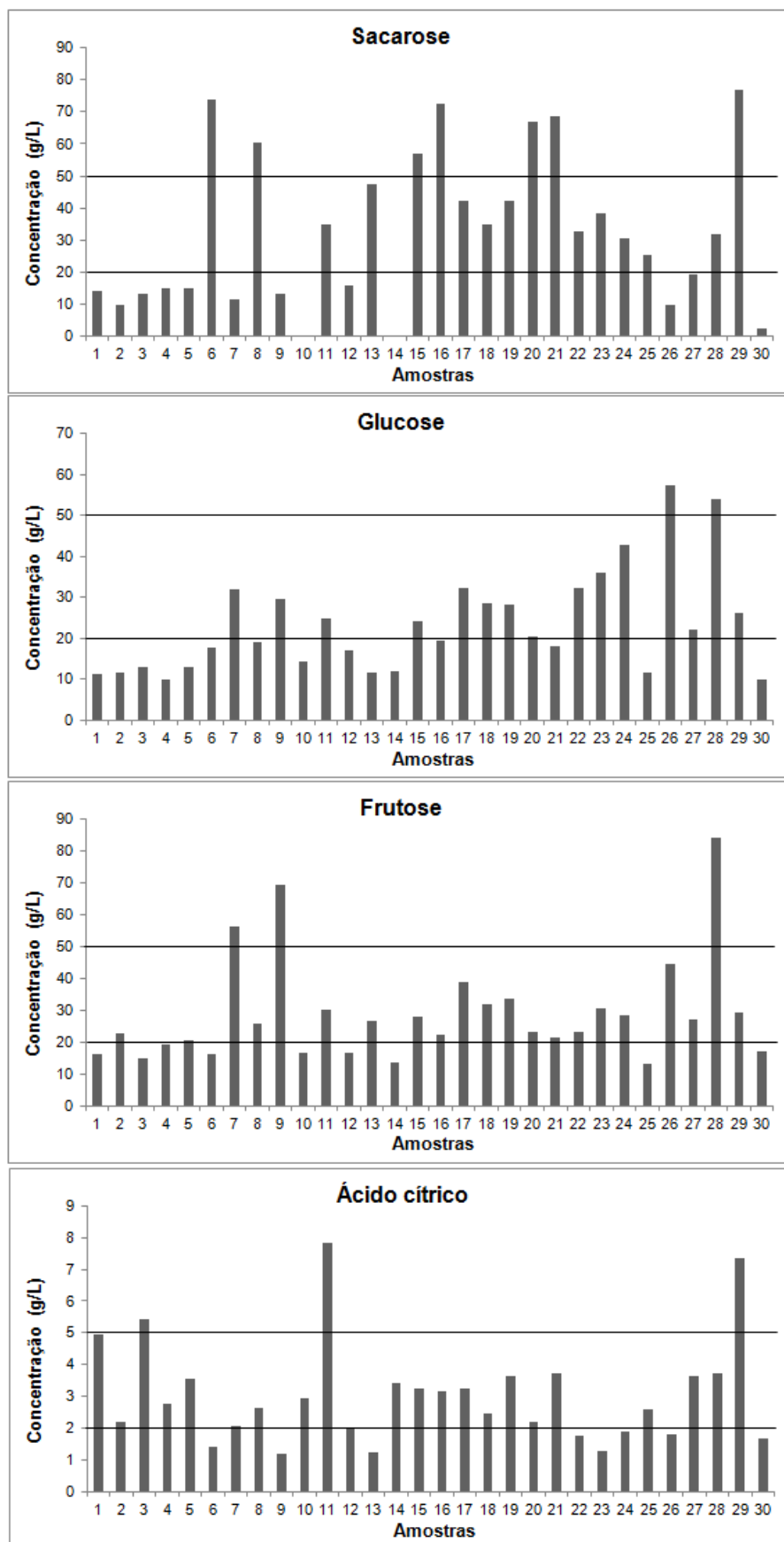


Figura 5 – Concentrações de sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico nas amostras analisadas.

Na Figura 6 apresenta-se um gráfico de análise de Clusters “Heat Map”, das concentrações de sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico, presentes nas amostras de sumos, bem como, às amostras com o objetivo de visualizar as suas semelhanças.

Apresenta-se também um mapa de cores onde se mostra a sua intensidade de acordo com a grandeza do valor (ver legenda) associado a cada variável química.

A interpretação dos resultados obtidos pela análise do dendograma foi efetuada com o auxílio dos gráficos da Figura 5.

Usando a informação fornecida pelo dendograma estabelecido para as amostras analisadas neste trabalho, podem-se destacar quatro grupos:

1º grupo – amostras A29, A6, A16, A21, A20, A8, A15 e A13;

2º grupo – amostras A11, A18, A19, A17, A 23, A22 e A24;

3º grupo – amostras A27, A25, A12, A3, A1, A5, A2, A4, A30, A14 e A10;

4º grupo – amostras A26, A7, A9 e A28.

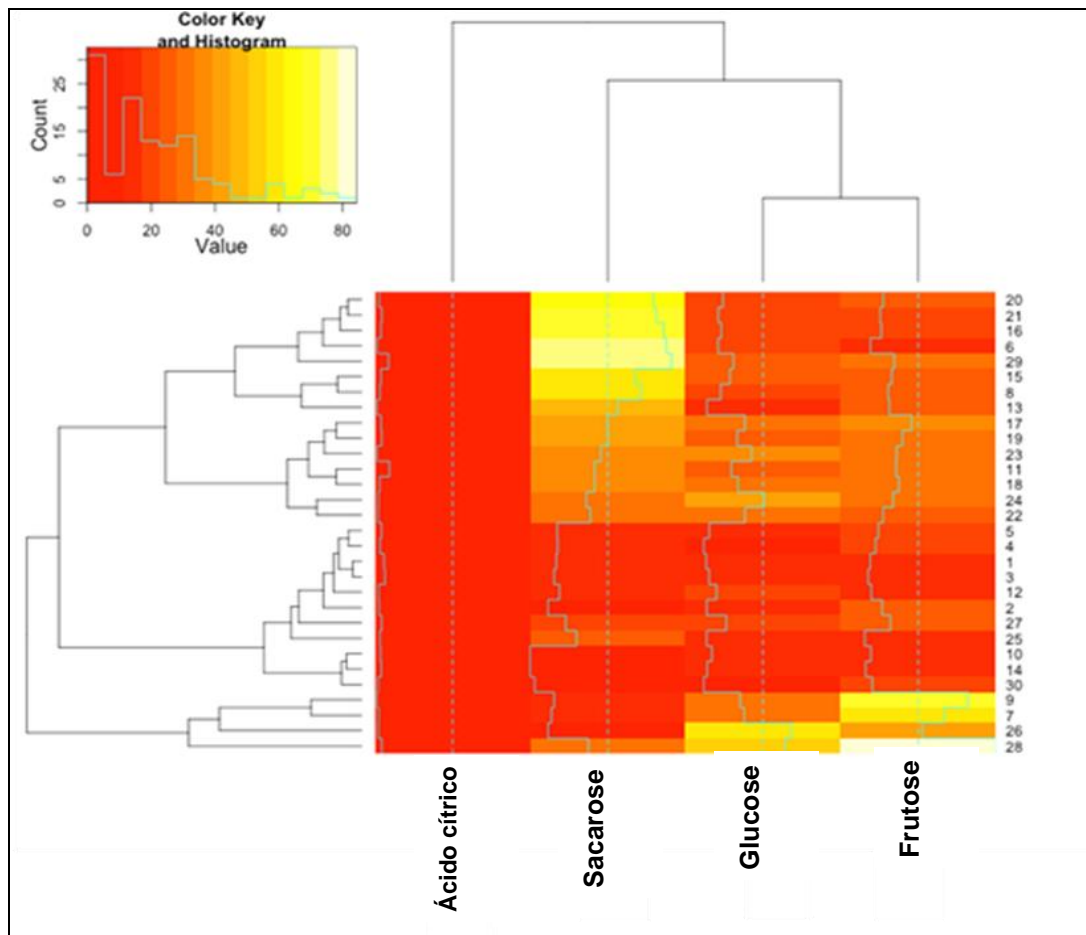
Se considerarmos a influência dos níveis de concentração da sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico na separação das amostras pode-se retirar as seguintes conclusões:

- o 1º grupo é constituído por quatro néctares e quatro refrigerantes e representa as amostras com maiores concentrações de sacarose;

- o 2º grupo é formado por um sumo e seis refrigerantes apresentado valores de concentração intermédios para a sacarose, glucose e frutose;

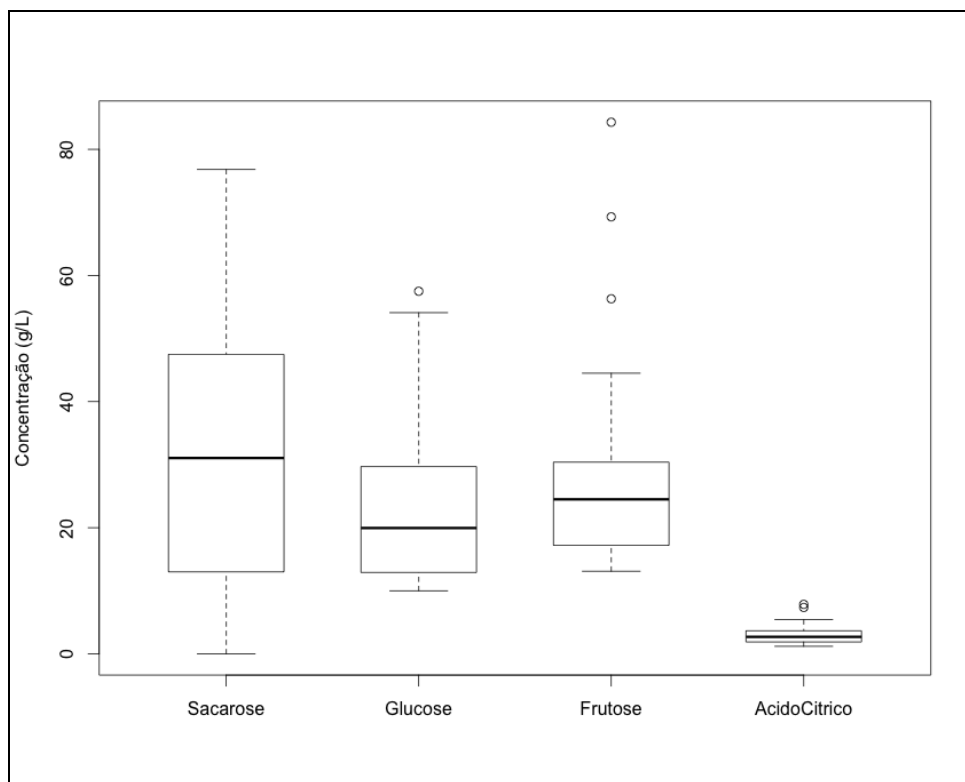
- o 3º grupo é composto por oito néctares e três refrigerantes e apresenta baixas concentrações de sacarose, glucose e frutose;

- o 4º grupo é constituído por um néctar, um sumo e dois refrigerantes e diz respeito às amostras que possuem maiores concentrações de frutose e glucose, e baixa concentração de sacarose e ácido cítrico, à exceção da amostra A28.



**Figura 6 – Dendogramas para as amostras de sumos e para as concentrações de sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico.**

A Figura 7 apresenta um gráfico de extremos e quartis para os valores das concentrações (g/L) dos açúcares e ácido cítrico. O gráfico mostra que a maior variabilidade das concentrações foi observada para a sacarose. O ácido cítrico foi aquele que apresentou uma menor dispersão dos resultados, mas este resultado está associado aos menores valores de concentração. A glucose e frutose são os compostos com concentrações mais semelhantes. Os pontos que saem do intervalo definido pelos extremos quartis para a glucose (uma amostra), frutose (três amostras) e ácido cítrico (duas amostras) são as amostras que apresentam níveis do composto bastante diferentes dos restantes.

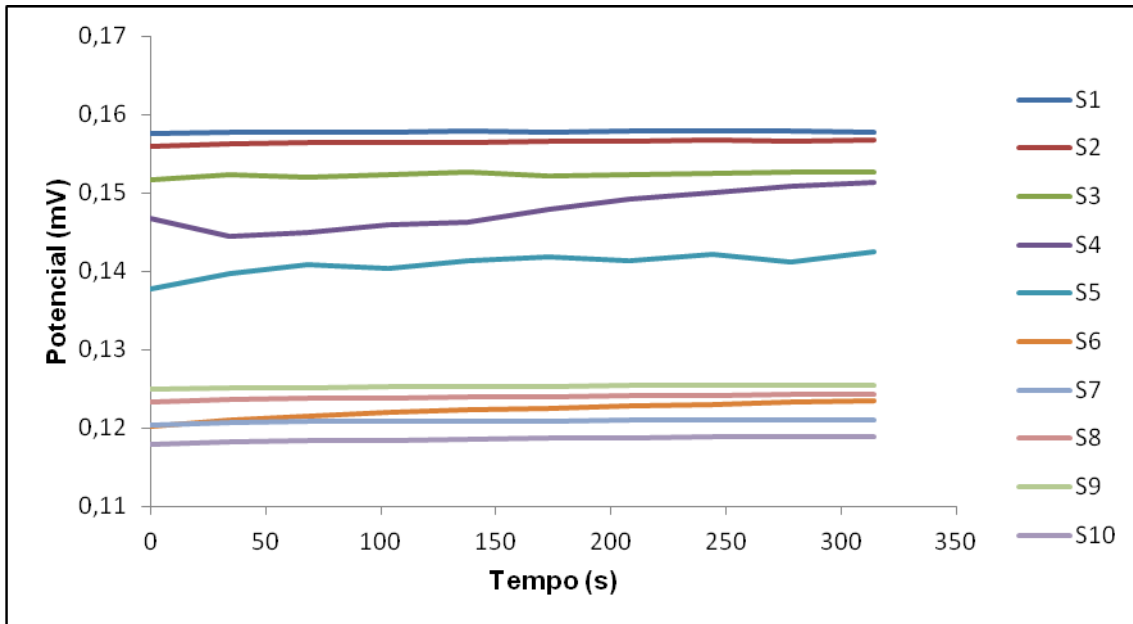


**Figura 7 – Gráfico de extremos quartis para os valores de concentração (g/L) da sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico.**

#### **4.2. Análise por língua eletrónica**

Neste trabalho utilizou-se uma língua eletrónica com sensores de sensibilidade cruzada e seletivos a iões (sistema de multi-sensores) com o objetivo de verificar a sua capacidade analítica para classificar os sumos usados, bem como, verificar a possibilidade de analisar semi-quantitativamente os sumos considerando dados de composição química obtidos por HPLC.

Na Figura 8 apresenta-se um exemplo da variação dos sinais de potencial para os dez primeiros sensores da língua eletrónica em função do tempo. Como se pode verificar, os sensores são estáveis ao longo do tempo e, em geral, os seus sinais estabilizam num minuto após inserção do sistema de multi-sensores na solução.

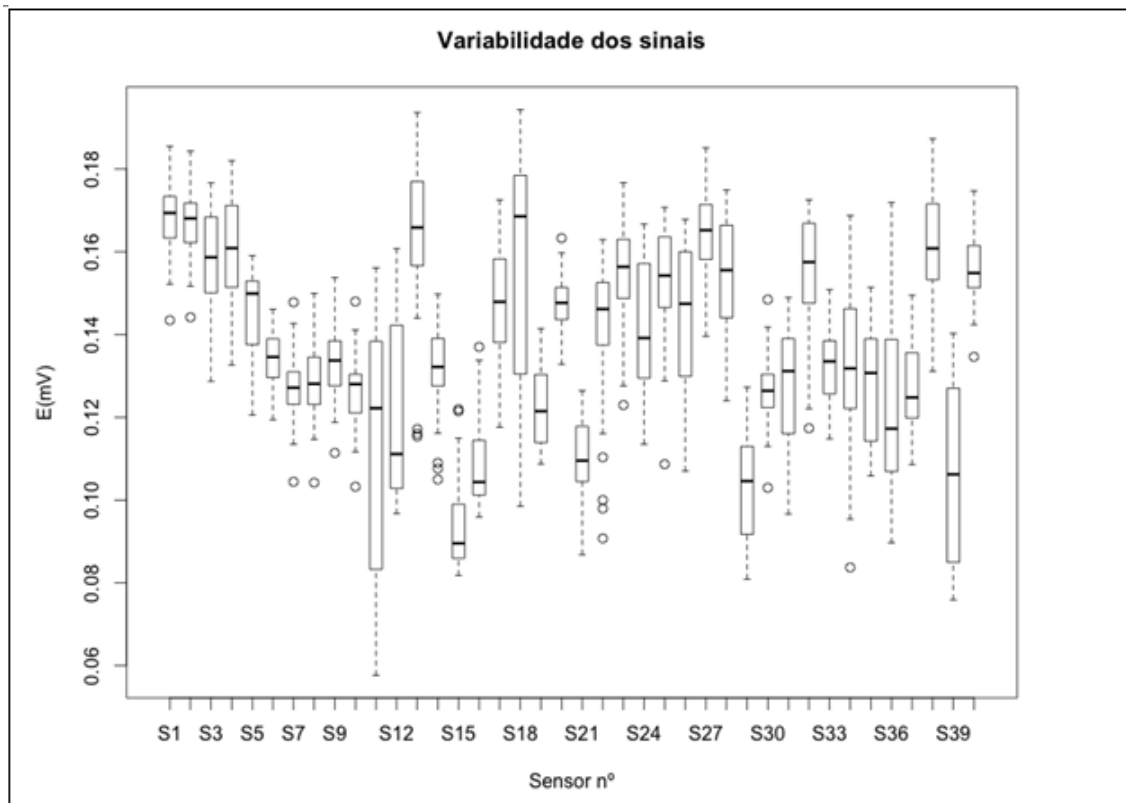


**Figura 8 – Variação dos sinais de potencial obtidos pelos sensores em função do tempo.**

Na Figura 9, mostra-se através de um gráfico de extremos e quartis a variabilidade dos sinais obtida pelos sensores na análise de todas as amostras.

A Figura 9 mostra que há sensores com grande variabilidade, sendo os sensores S11, S12, S18 e S39 os que apresentam uma maior variabilidade.

Verifica-se também que 45% dos sensores mostram “outliers” na representação gráfica mas, em geral, registam amostras que não são comuns, ou seja, são máximos ou mínimos no sinal mas para diferentes amostras. Logo, não se removeram as amostras por se considerarem que os sinais resultam de influências pontuais da matriz da respectiva amostra.



**Figura 9 – Gráfico de extremos e quartis do estudo da variabilidade dos sinais da língua eletrônica obtida na análise às amostras.**

Na Figura 10 apresenta-se um gráfico de análise de clusters “Heat Map” para as amostras e sinais obtidos pelos sensores.

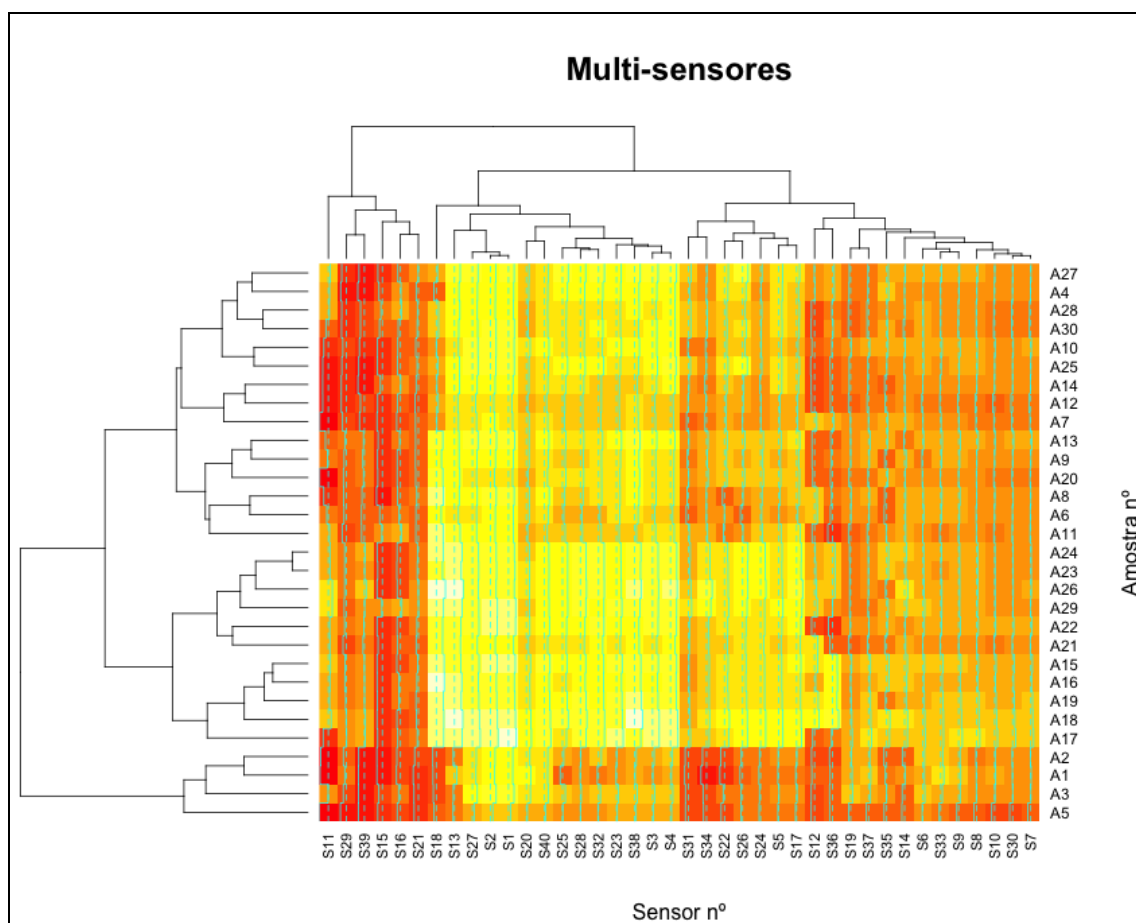
A análise dos dois dendogramas representados na Figura 10 permite-nos observar três grupos distintos quer em relação às amostras quer para os sinais obtidos dos sensores. Em relação às amostras verificamos os seguintes grupos:

- o 1º grupo agrupa as amostras A4, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A20, A25, A27, A28 e A30;
- o 2º grupo é constituído pelas amostras A15, A16, A17, A18, A19, A21, A22, A23, A24, A26 e A29;
- o 3º grupo possui as amostras A1, A2, A3 e A5.

Quanto aos sensores os grupos obtidos foram:

- o 1º grupo contém os sensores S11, S15, S16, S21, S29 e S39;
- o 2º grupo abrange os sensores S1, S2, S3, S4, S13, S18, S20, S23, S25, S27, S28, S32, S38 e S40;

- o 3º grupo é constituído pelos sensores S5, S6, S7, S8, S9, S10, S12, S14, S17, S19, S22, S24, S26, S30, S31, S33, S34, S35, S36 e S37.



**Figura 10 – Dendogramas para as amostras de sumos e para os sinais obtidos dos sensores.**

Os grupos formados (quer para as amostras quer para os sensores) não possuem nenhuma característica que justifique a separação entre eles, o que significa que devem ter sido formados tendo em conta não uma mas sim várias características. No caso dos sensores, todos os grupos incluem sensores de sensibilidade cruzada e seletivos a iões.

A seguir mostram-se os resultados da aplicação da análise de componentes principais (ACP) com o objetivo de verificar, com outro método multivariado não supervisionado, se a variabilidade apresentada no dendrograma obtido para as amostras se mantinha. Na Figura 11 apresenta-se o gráfico bidimensional da ACP onde se visualiza os diferentes grupos formados pela primeira e segunda componente principal.

Verificou-se que as duas primeiras componentes principais explicavam 80,6% da variabilidade total. A primeira componente (PC1) explica 60,4% da variância total e a segunda componente (PC2), 20,2%.

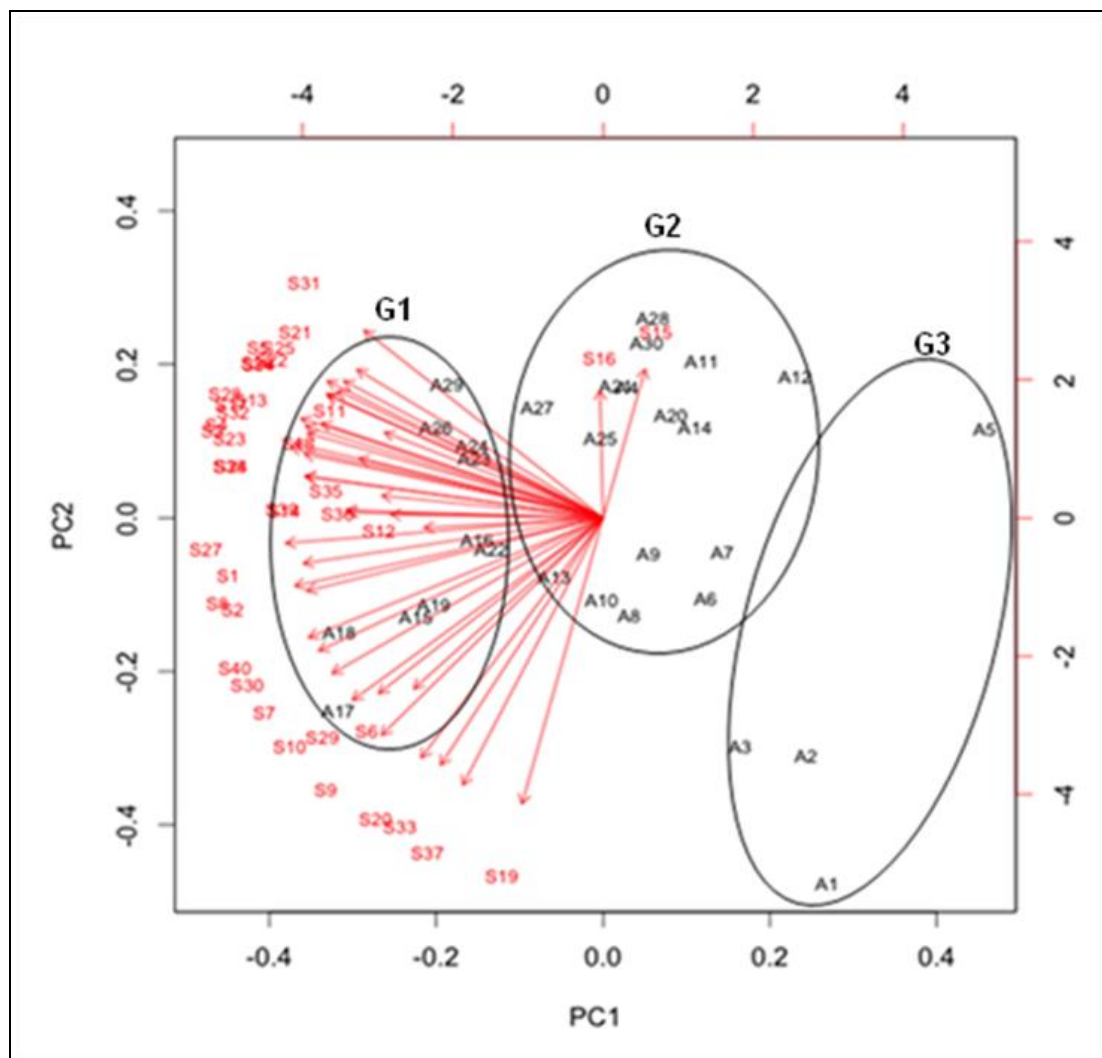


Figura 11 – Análise das componentes principais PC1 e PC2 obtido a partir da matriz dos sinais dos sensores referentes à análise das amostras (G1 - grupo 1, G2 - grupo 2, G3 - grupo 3).

No gráfico (Figura 11) destacam-se três grupos: o 1º grupo engloba as amostras A15, A16, A17, A18, A19, A22, A23, A24, A26 e A29; o 2º grupo as amostras A4, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A20, A21, A25, A27, A28 e A30; e, por fim, o terceiro grupo abrange A1, A2, A3 e A5. Através da primeira componente principal é possível distinguir dois grupos bem definidos (grupo 1 e grupo 3). O grupo 1 encontra-se bem evidenciado para valores

negativos do PC1 e o grupo 3, para valores positivos do PC1. Tal distinção dos dois grupos deve-se ao grupo 2 se encontrar no meio da representação gráfica, para valores centrais do PC1. A segunda componente principal divide cada grupo formado em sub-grupos. Estes resultados são semelhantes aos agrupamentos encontrados no dendograma, para as amostras, apresentado na Figura 10.

Para estudar a capacidade dos 40 sensores, presentes no sistema de multi-sensores, em classificar as amostras segundo grupos definidos tendo em conta intervalos de concentração de um dado composto (análise semi-quantitativa), foi utilizado a análise discriminante linear (ADL) com “stepwise” de forma a selecionar os sensores com informação relevante para o estudo. Este método estatístico foi efetuado para cada um dos compostos maioritários na composição dos sumos: sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico. Testaram-se vários agrupamentos das amostras com diferentes intervalos de concentração para cada um dos compostos referidos. Verificou-se que os modelos ADL obtidos não classificavam corretamente as amostras se os grupos considerados fossem mais do que dois. Estes resultados podem indicar que o perfil de sinais obtido da análise a cada amostra, com o sistema de multi-sensores, poderá ter informação não linear.

De seguida são discutidos os resultados obtidos com análise discriminante linear para a sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico quando se separam as amostras em dois grupos considerando um limite de concentração definido atendendo às variações das concentrações de cada composto nos sumos. Para verificar se as funções eram significativas, foi aplicado o teste “Wilks’ Lambda” (quando o valor de  $p < 0,05$ , indica que as funções discriminantes são significativas).

**Sacarose.** As amostras foram divididas em dois grupos considerando que a concentração em sacarose era: grupo 1 - [sacarose]  $\leq 40$ g/L e grupo 2 - [sacarose]  $> 40$ g/L. O grupo 1 contém dezoito amostras e o grupo 2, dez amostras. O modelo obtido é constituído por apenas uma função discriminante que traduz 100% da variabilidade inicial dos resultados. Através do teste “Wilks’ Lambda” verificou-se que a função era significativa (valor de  $p = 0,00003$ ). O

modelo ADL permitiu classificar corretamente todas as amostras (100% de classificações corretas).

A avaliação do desempenho do modelo na previsão do grupo a que cada amostra correspondia foi efetuada recorrendo a validação cruzada, usando o procedimento “leave-one-out”, encontrando-se os resultados na Tabela 15.

**Tabela 15 – Matriz de contingência da classificação dos dois grupos de amostras pelo procedimento da validação cruzada para a sacarose.**

<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>% correta</b>
1	17	1	94
2	0	10	100
Total	17	11	96

Das dezoito amostras pertencentes ao grupo 1, dezassete foram bem classificadas; as dez amostras do grupo 2 foram todas corretamente classificadas. Verifica-se que o modelo mostra uma boa capacidade de prever as amostras uma vez que, globalmente, 96% das amostras estão corretamente classificadas. O modelo obtido por “stepwise” usa os sinais de catorze sensores que são: S1, S2, S3, S5, S9, S10-S13, S15, S16, S18, S20 e S23. Exceto o sensor S23, todas os outros são de membranas seletivas a iões.

**Glucose.** Com o objetivo de verificar se era possível extrair dos sinais dos sensores informação sobre a glucose, as amostras foram separadas em dois grupos tendo em conta se as concentrações de glucose eram  $\leq 25$  ou  $> 25$ g/L. O grupo 1 contém dezoito amostras e o grupo 2, constituído por doze amostras. O modelo classificou corretamente todas as amostras. Aplicou-se a ADL e, através do teste de “Wilks’Lambda” verifica-se que a função era significativa, pois o valor de  $p=0,0001$ .

Para avaliar o desempenho do modelo relativamente à capacidade de previsão do grupo a que cada amostra se enquadrava, foi efetuada a validação cruzada, usando o método “leave-one-out”, e os resultados estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16 – Matriz de contingência da classificação dos dois grupos de amostras pelo procedimento da validação cruzada para a glicose.**

<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>% correta</b>
1	17	1	94
2	0	12	100
Total	17	13	97

Os resultados presentes na matriz de contingência mostram que das catorze amostras pertencentes ao grupo 1, uma foi mal classificada e todas as amostras do grupo 2, foram bem classificadas. Verifica-se que o modelo mostra ter uma capacidade aceitável de prever as amostras utilizadas, visto que 97% das amostras foram corretamente classificadas. O modelo obtido por “stepwise” utiliza quinze sensores que são: S3, S4, S13, S14, S16-S21, S26, S27, S29, S37 e S40. Os sensores são maioritariamente de membrana seletivas a iões.

**Frutose.** Para a frutose manteve-se o mesmo critério que foi usado no estudo efetuado com os níveis de glicose. Considerou-se no grupo 1, as amostras com níveis de frutose  $\leq 25\text{g/L}$  (quinze amostras) e no grupo 2, as amostras com níveis  $>25\text{g/L}$  (quinze amostras). O modelo obtido para separar os dois grupos estabelecidos corresponde a uma função discriminante que é significativa pois  $p=0,001$  no teste “Wilks’ Lambda”, que permite classificar todas as amostras corretamente.

Recorreu-se à validação cruzada para avaliar o desempenho do modelo nas previsões dos grupos de cada amostra. Os resultados da validação cruzada estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17 – Matriz de contingência da classificação dos dois grupos de amostras pelo procedimento da validação cruzada para a frutose.**

<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>% correta</b>
1	14	1	93
2	3	12	80
Total	17	13	87

Verifica-se que sete amostras do grupo 1 foram bem classificadas, estando uma amostra mal classificada. Doze amostras do grupo 2, de um total de quinze amostras, foram corretamente classificadas. O modelo conseguiu classificar corretamente 87% das amostras. Os doze sensores que o modelo

(obtido por “stepwise”) utiliza são: S1, S4, S5, S7, S8, S14, S18-S20, S23, S35 e S37.

**Ácido cítrico.** Nas amostras de sumos, os níveis de concentração em ácido cítrico são mais baixos comparativamente aos dos açúcares. Os dois grupos de amostras foram obtidos considerando os níveis em ácido cítrico  $\leq 2\text{g/L}$  (grupo 1, com oito amostras) e  $> 2\text{g/L}$  (grupo 2, com vinte e duas amostras). O grupo 1 contém oito amostras e o grupo 2, vinte e duas amostras. Também se aplicou a ADL com o objetivo de verificar se os sensores permitem definir um modelo que classifique as amostras nestes dois grupos. Em ambos os grupos, as amostras foram todas corretamente classificadas, o que significa que o modelo traduz 100% da variabilidade inicial dos resultados. O teste de “Wilks’ Lambda” mostrou que a função era significativa (valor de  $p=0,003$ ).

Efetou-se a validação cruzada para avaliar o desempenho do modelo em prever a que grupo cada amostra correspondia, encontrando-se os resultados na Tabela 18.

**Tabela 18 – Matriz de contingência da classificação dos dois grupos de amostras pelo procedimento da validação cruzada para o ácido cítrico.**

<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>% correta</b>
1	6	2	75
2	4	18	82
Total	10	20	80

Verifica-se que seis amostras do grupo 1 foram bem classificadas e duas mal classificadas. Das vinte e duas amostras do grupo 2, quatro foram mal classificadas. O modelo classifica corretamente 80% das amostras, o que significa que possui uma capacidade aceitável de previsão das amostras usadas. Os sensores que o modelo, obtido por “stepwise”, utiliza são: S1-S5, S7, S8, S11-S13, S18 e S36. Dos doze sensores que o modelo ADL usa, só um é de membrana de sensibilidade cruzada (S36).

Globalmente, verifica-se que o melhor modelo de classificação das amostras entre dois grupos estabelecidos em função dos níveis de concentração para cada composto estudado, considerando os resultados da validação cruzada, foi para a glucose (97% das amostras foram bem

classificadas), seguindo-se a sacarose (96% das amostras bem classificadas) e depois a frutose (87% das amostras bem classificadas). O modelo com pior desempenho de previsão foi obtido no estudo com o ácido cítrico.

A preponderância de sensores com membranas seletivas a iões nos modelos ADL leva a colocar a hipótese de que a metodologia “stepwise” com seleção de variáveis “backward” pode condicionar a construção do modelo. Ou seja, como a técnica corresponde à eliminação de variáveis, esta parece escolher sempre as últimas como primeira opção de remoção. Em estudos futuros deve-se pensar em usar com ADL novas metodologias de seleção de variáveis.

## 5. CONCLUSÃO FINAL

Neste trabalho, usou-se o HPLC para analisar açúcares (sacarose, glucose, frutose) e ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido ascórbico e ácido acético) em sumos comerciais, não alcoólicos. Posteriormente, os mesmos sumos foram analisados com uma língua eletrónica com o objetivo de testar a sua aplicabilidade na classificação semi-quantitativa dos sumos tendo em conta os dados de composição química obtidos por HPLC.

No estudo da validação do método analítico HPLC através da precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e da exatidão, verificou-se que:

- os resultados obtidos no estudo da precisão da solução de controlo de qualidade foram aceitáveis ( $sr\% \leq 5\%$ ) exceto para o ácido ascórbico e ácido acético relativamente à precisão intermédia;

- os resultados do estudo da precisão para uma amostra foram todos aceitáveis quer no estudo da repetibilidade quer no da precisão intermédia;

- no estudo da exatidão do método, os resultados foram aceitáveis (com erros relativos percentuais iguais ou inferiores a 5% exceto em situações pontuais associadas a má preparação de soluções) quando se analisaram três soluções de controlo de qualidade.

Da análise dos compostos presentes nas amostras de sumos verificou-se que:

- a sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico foram detetados e quantificados praticamente em todas as amostras;

- a análise dos ácidos acético e málico apresentou dificuldades quer na deteção quer na quantificação;

- o ácido tartárico e o ácido láctico não foram detetados em nenhuma amostra.

As amostras de sumos foram analisadas com uma língua eletrónica usando dois sistemas de multisensores: o primeiro sistema continha membranas de iões seletivos; o segundo, continha membranas de sensibilidade cruzada. Da análise com a língua eletrónica obteve-se um perfil de sinais (40 sinais) que é característico de cada amostra.

Usando os perfis de sinais obtidos com a língua eletrônica, através da análise de componentes principais e da análise de clusters, foi possível verificar que os três grupos de amostras obtidos por ACP eram semelhantes aos grupos de amostras obtidos através da análise de clusters, o que demonstra coerência nos resultados. Porém não foi possível evidenciar qualquer característica que justifique a separação entre eles, o que provavelmente significa que a separação dos sumos se deve a um conjunto de características e não a uma específica. Estes resultados mostram que é necessário aplicar metodologias multivariadas mais avançadas para extrair informação que permita dar sentido aos resultados obtidos.

Estudou-se também a capacidade dos perfis de sinais da língua eletrônica em classificar as diferentes amostras tendo em conta intervalos de concentração para cada um dos compostos: sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico. Estes compostos foram selecionados para este estudo em detrimento dos outros por terem as concentrações mais elevadas e por estarem presentes em todas as amostras. Através da ADL “stepwise” com “backward elimination”, concluiu-se que o melhor modelo de classificação das amostras em dois grupos, considerando os resultados da validação cruzada, diz respeito à glucose, com 97% das amostras bem classificadas. O pior modelo de previsão foi obtido no estudo da classificação das amostras com base em informação do ácido cítrico.

Com este trabalho, verificou-se que a metodologia usada na seleção dos sensores para obter o melhor modelo ADL poderá não ser o mais adequado, devendo-se desenvolver um algoritmo que permita selecionar variáveis em grupos, de forma, a se estudar todas as combinações possíveis.

Outras situações que devem ser consideradas em trabalhos futuros:

- introdução de mais sensores com membranas de sensibilidade cruzada atendendo a bons resultados obtidos em trabalho anterior [61];

- outros métodos estatísticos multivariados de classificação não lineares por haver indícios de não linearidade nos perfis dos sinais da língua eletrônica obtidos para as amostras usadas nos estudos de classificação efetuados.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] P. R. Ashurst, Chemistry and Technology of Soft drinks and Fruit Juices, Blackwell Publishing, 2<sup>o</sup> Edition, Hereford, UK, 2005;
- [2] Decreto-Lei nº 225/2003, Diário da República, nº221, Série I-A de 2003-09-24;
- [3] Portaria nº 703/96, Diário da República, nº282, Série I-B de 1996-12-06;
- [4] C. P. Pirillo e R. P. Sabio, Revista Hortifruti Brasil, Julho 2009;
- [5] H. D. Belitz, W. Grosch, Química de los alimentos, Editorial Acribia, S.A, 2<sup>o</sup> Edición, Zaragoza, Espanha, 1997;
- [6] W. G. V. Filho, Bebidas Não Alcoólicas, Blucher, Vol. 2, Brasil, 2010;
- [7] Associação Nacional dos industriais de refrigerantes e sumos de frutos (ANIRSF), Guia para a rotulagem de Bebidas Refrigerantes, Sumos de frutos e Néctares, Junho 2001;
- [8] E. P. Yúfera, Química de los alimentos, Editorial Sintesis, Madrid, Espanha, 1998;
- [9] A. C. S. Lima, J. C. Afonso, A Química do refrigerante, Vol. 31, 3, Agosto 2009;
- [10] J. Prando, M. A. Prado, Determinação de corantes artificiais em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência, Revista Analytica, 29, Junho/Julho 2007;
- [11] Y. Zhu, Y. Guo, M. Ye, F. S. James, Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography, Journal of Chromatography A, 1085 (2005) 143–146;
- [12] D.R. Lide, CRC Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, 9<sup>th</sup> Ed., 2010;
- [13] J. M. deMan, Principles of Food Chemistry, Chapman & Hall, New York, USA, 2<sup>o</sup> Edition, 1990;
- [14] L. Saavedra, A. García, C. Barbas, Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in Orange juice, Journal of Chromatography A, 881 (2000) 395-401;

- [15] F. Tezcan, M. Gültekin-Özgülven, T. Diken, B. Özçeli, F. B. Erim, Antioxidant activity, total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices, *Food Chemistry*, 115 (2009) 873-877;
- [16] B. M. Silva, R. M. Seabra, P. B. Andrade, M. B. Oliveira, M. A. Ferreira, Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: uma revisão, *Cienc. Tecnol. Aliment*, Vol. 2, 4 (1999) 184-191;
- [17] H. N. Low, Determination of fruit juice authenticity by capillary gas chromatography with flame ionization detection, vol. 79, 3 (1996) 724-737;
- [18] J. Bricout, J. Koziat, Control of the authenticity of orange juice by isotopic analysis, *J. Agric. Food Chem.*, 35 (1987) 758-760;
- [19] J. G. Stuckel, N. H. Low, Maple Syrup Authenticity Analysis by anion-exchange liquid chromatography with pulsed amperometric detection, *J. Agric. Food Chem.*, 43 (1995) 3046-3051;
- [20] L. E. Rodriguez-Saona, F. S. Fry, M. A. McLaughlin and E. M. Calvey, Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT – NIR spectroscopy, vol. 336, 1 (2001) 63-74;
- [21] F. Garcia-Wass, D. Hammond, D. S. Mottram, C. S. Gutteridge Detection of fruit juice authenticity using pyrolysis mass spectroscopy, *Food Chemistry*, 69 (2000) 215-220;
- [22] A. Trifiró, G. Sacconi, S. Gherardi, E. Vicini, E. Spotti, M. P. Previdi, M. Ndagijimana, S. Cavalli, C. Reschiotto, Use of ion chromatography for monitoring microbial spoilage in the fruit juice industry, *Journal of Chromatography A*, 770 (1997) 243-252;
- [23] T. Foster, P. C. Vasavada, *Beverage Quality And Safety*, Institute of Food Technologists, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2003;
- [24] A. M. Bordim, C. R. Matte, C. D. C. Polo, R. F. Koch, Avaliação microbiológica de sucos de laranja in natura não pasteurizados comercializados durante a 16ª fenasoja, no município de Santa Rosa – RS, Acadêmicas do curso de Química Industrial de Alimentos da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul / Uergs – Santa Rosa/RS;
- [25] V.H Tournas, J. Heeres, L. Burgess, Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices, *Food Microbiology*, 23 (2006) 684–688;

- [26] C. K. Ruschel, H. H. Carvalho, R. B. Souza, E. C. Tondo, Qualidade microbiológica e físico-química de sucos de laranja, comercializados nas vias públicas de Porto Alegre/RS, Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, vol. 1, 21 (2001) 94-97;
- [27] S. S. Nielsen, Análisis De Los Alimentos, Editorial Acribia, S.A, Zaragoza, Espanha, 2009;
- [28] C. B. G. Bottoli, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Instituto de Química, UNICAMP;
- [29] M. C. McMaster, HPLC A Pratical User's Guide, 2<sup>o</sup> Edition, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2007;
- [30] A. Braithwaite, F. J. Smith, Chromatographic Methods, Blackie Academic & Professional, 5<sup>o</sup> Edition, Bristol, Great Britain, 1996;
- [31] S. S. Nielsen, Análisis De Los Alimentos Manual De Laboratorio, Editorial Acribia, S.A, Zaragoza, Espanha, 2007;
- [32] V. R. Meyer, Pratical High-Performance Liquid Chromatography, Wiley, 5<sup>o</sup> Edition, Padstow, Great Britain, 2010;
- [33] D. J. Cziczo, Chromatography Lecture 4: LC, HPLC and IC, Mass Spectrometry & Chromatography, CIRES and NOAA, Fall 2004;
- [34] O. A. Quattrocchi, S. A. Andrizzi, R. F. Laba, Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica, Artes Gráficas Farro SA, Buenos Aires, Argentina, 1992;
- [35] Separation of Organic Acids in Beverages Using a SUPELCOGEL™ C-610H HPLC Column, Sigma-Aldrich Co, 1995;
- [36] J. S. Fritz, Early milestones in the development of ion-exchange chromatography: a personal account, Journal of Chromatography A, 1039 (2004) 3–12;
- [37] F. Rouessac, A. Rouessac, Analyse Chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes, Dunod, 6<sup>o</sup> édition, Paris, France, 2004;
- [38] Y. V. Heyden, S.T. Popovici, P.J. Schoenmakers, Evaluation of size – exclusion chromatography and size exclusion electrochromatography calibration curves, Vol. 957, 2 (2002) 127-137;

- [39] L. Escuder-Gilabert, M. Peris, Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis, *Analytica Chimica Acta*, 665 (2010) 15–25;
- [40] L. Dias, A. Peres, A. Veloso, F. Reis, M. Vilas-Boas, A. Machado, An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk, *Sensors and Actuators B*, 136 (2009) 209–217;
- [41] Yu. 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;
- [42] K. Toko, Electronic tongue, *Biosensors & Bioelectronics*, 13 (1998) 701–709;
- [43] K. Toko, Electronic sensing of tastes, *Electroanalysis*, 10 (1998) 657–669;
- [44] K. Toko, Taste sensor, *Sensors and Actuators B*, 64 (2000) 205–215;
- [45] J. Wang, *Analytical electrochemistry*, 3<sup>o</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2006;
- [46] 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;
- [47] 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 (2002) 33–44;
- [48] 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;
- [49] 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;

- [50] 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;
- [51] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, Electronic tongues and their analytical application, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 136–146;
- [52] 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;
- [53] M. de Sena, R. Poppi, R. Frighetto, P. Valarini, Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos, *Química nova*, vol. 4, 23 (2000);
- [54] J. Maroco, *Análise Estatística, com utilização do SPSS*, Edições Sílabo, Lisboa, Portugal, 2003;
- [55] E. Vérette, F. Qian, F. Mangani, On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages, *Journal of Chromatography A*, 705 (1995) 195-203;
- [56] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1026 (2004) 57–64;
- [57] H. A. Eyéghé-Bickong, E. O. Alexandersson, L. M. Gouws, P. R. Young, M. A. Vivie, Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries, *Journal of Chromatography B*, 885– 886 (2012) 43– 49;
- [58] G. Shui, L. P. Leong, Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 977 (2002) 89–96;
- [59] R. Scherer, A. C. P. Rybka, C. A. Ballus, A. D. Meinhart, J. T. Filho, H. T. Godoy, Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices, *Food Chemistry xxx* (2012) xxx–xxx;
- [60] C. I. Rodrigues, L. Marta, R. Maia, M. Miranda, M. Ribeirinho, C. Máguas, Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and

organic acid determination by UV/HPLC, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (2007) 440–448;

[61] T. Barcelos, Análise semi-quantitativa e quantitativa de bebidas não alcoólicas com uma língua eletrónica, Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança, 2009.